

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini)

ZUR HÄUFIGKEIT EINER MAKROAMYLASÄMIE UND
ZUR DIAGNOSTISCHEN WERTIGKEIT DES QUOTIENTEN
AMYLASECLEARANCE / KREATININCLEARANCE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

DETLEF BINDRICH
—
aus Greifswald

Marburg 1977
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini)

ZUR HÄUFIGKEIT EINER MAKROAMYLASÄMIE UND
ZUR DIAGNOSTISCHEN WERTIGKEIT DES QUOTIENTEN
AMYLASECLEARANCE / KREATININCLEARANCE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DETLEF BINDRICH

aus Greifswald

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 15.4.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan :	Prof. Dr. F. Neurath
Referent :	Prof. Dr. Ch. Bode
Correferent :	Prof. Dr. S. Massarrat

MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Auszugsweise schon vorgetragen anlässlich

- 1) der 82. Tagung der Deutschen
Gesellschaft für Innere Medizin,
Wiesbaden, 25.-29.4.1976
- 2) der 31. Tagung der Deutschen
Gesellschaft für Verdauungs-
und Stoffwechselerkrankungen,
Lübeck-Travemünde, 30.9.-2.10.1976
- 3) des IXth meeting des European
Pancreatic Club,
Oslo, 14.-16.10.1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodischer Teil	3
1. Krankengut	3
2. Methoden zum Nachweis einer Makroamylase	6
A. Gelfiltration	6
a) Materialien	6
b) Füllen der Säule	8
c) Nachweis der Amylase im Eluat	9
d) Versuchsdurchführung	9
e) Auswertung der Vorversuche	11
f) Diskussion der Methode	11
B. Dünnschichtchromatographie	13
a) Substanzen	13
b) Versuchsdurchführung	14
C. Ultrazentrifugation	15
a) Dichtegradient	15
b) Versuchsdurchführung	16
D. Elektrophorese	17
a) Materialien	17
b) Versuchsdurchführung	18
c) Variationen der Versuchsdurchführung	19
3. Enzymbestimmungen	20
a. Amylase	20
b. Kreatinin	20
c. Aufbewahrung der Seren	20
4. Quotient Amylaseclearance zu Kreatinin- clearance	22

III. Ergebnisse	23
1. Gelfiltration	23
a) Elutionsprofile	23
b) Krankengeschichten der Patienten mit Makroamylasämie	24
2. Dünnschichtchromatographie	28
3. Ultrazentrifugation	28
4. Elektrophorese	29
5. Quotient Amylaseclearance zu Kreatinin- clearance	30
Abb. 1 bis Abb. 26	33-58
IV. Diskussion	59
1. Methoden zum Nachweis einer Makroamylasämie ..	59
2. Die physikalisch-chemische Natur der Makroamylase	62
3. Klinische Bedeutung einer Makroamylasämie ...	65
4. Besprechung der eigenen Fälle von Makro- amylasämie	66
5. Höhe der Serumamylasespiegel bei Makro- amylasämie	67
6. Die Häufigkeit einer Makroamylasämie	69
7. Der Quotient aus Amylaseclearance und Kreatininclearance	70
a) Theoretische Überlegungen und Angaben der Literatur	70
b) Eigene Ergebnisse	72
V. Zusammenfassung	75
VI. Literaturverzeichnis	78
VII. Anhang	86

I. E i n l e i t u n g

=====

Erhöhte Amylasewerte im Serum (27) werden bei allgemeinen Pankreas- und anderen abdominellen Erkrankungen (22, 36, 55) (wie Ulcus- und Gallenblasenperforation, hohem Ileus, Peritonitis, Salpingitis, Extrauterin gravidität, Mesenterialinfarkt), bei Speicheldrüsenerkrankungen, Niereninsuffizienz, nach Opiat-medikation, paraneoplastisch beim Bronchialcarcinom, bei allgemeinen Virusinfektionen (z.B. Mumps) und postoperativ bei Abdominal-eingriffen (21, 32, 45, 46) festgestellt.

1964 wurde erstmals von WILDING P. und Mitarbeitern (69) bei einem Patienten eine proteingebundene Amylase nachgewiesen. Bei diesem Patienten lag eine deutlich erniedrigte Amylase-clearance mit normalen Urinamylasewerten und eine normale Nierenfunktion vor. BERK J.E. (9) führte für diese sehr seltene Erscheinung 1967 den Begriff der MAKROAMYLASÄMIE ein, der sich auch allgemein durchsetzte.

Auf die meisten der in den folgenden Jahren nachgewiesenen Fälle mit Makroamylasämie (10, 31, 42, 61, 64) wurde man aufmerksam durch eine enorme Diskrepanz zwischen normalen Nierenfunktions- und Urinamylasewerten einerseits und hohen Serumamylasewerten andererseits. Eine Erklärung konnte hierfür nicht angegeben werden.

Die Konstanz der oben angegebenen laborchemischen Werte veranlaßten LEVITT M.D. et al. (43), den

Quotienten aus Amylaseclearance zu Kreatinin-clearance als diagnostisches Hilfsmittel zur einfachen und schnellen Makroamylasämieerkennung an Patienten anzugeben. Dieser Quotient schien sich bei den in der Literatur angegebenen Fällen bewährt zu haben.

Die bisher zu diesem Thema erschienenen Arbeiten wurden größtenteils in den USA durchgeführt. Von annähernd 50 Fällen wurde darin berichtet. Im deutschen Sprachraum wurden bisher nur vereinzelt Fälle von Makroamylasämie mitgeteilt (34, 56, 59). Über die systematische Durchuntersuchung eines Patientenkollektivs erschien nur eine Arbeit von BARROWS D. (3) und von IMRIE C.W. et al. (30). Hier wurde erstmals das Vorkommen einer Makroamylase bei Patienten mit normalen Serumamylasewerten beschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist, die Häufigkeit einer Makroamylasämie an der Marburger Universitätsklinik in einem Zeitraum von 11 Monaten festzustellen. Zu diesem Zweck wurde bei allen Patienten, mit bei Aufnahme erhöhten Amylasewerten, das Serum auf das Vorliegen einer Makroamylasämie säulenchromatographisch untersucht. Andere Methoden (Dünnschichtchromatographie, Elektrophorese, Ultrazentrifugation) wurden auf ihre Brauchbarkeit überprüft.

Außerdem sollte der Quotient Amylaseclearance zu Kreatinin-clearance an unserem Patientenkollektiv auf seine diagnostische Wertigkeit bei Makroamylasämie, akuter Pankreatitis und Niereninsuffizienz untersucht werden.

II. Methodischer Teil

=====

1. Krankengut

Die Untersuchung umfaßte 106 männliche und 63 weibliche Patienten im Alter von 18 bis 86 Jahren, die in der medizinischen Universitätsklinik stationär behandelt wurden. Maßgebend für die Aufnahme in die Studie waren zunächst Patienten mit Serumamylasewerten von 350 IE/ml und darüber, später (seit Februar 1975) auch mit Werten ab 300 internationalen Einheiten.

Außerdem wurden 21 Patienten der chirurgischen Universitätsklinik mit einbezogen, die eine akute abdominelle Symptomatik (Pankreatitis, Ulcera, Gallenblasenerkrankungen, abdominale Prellungen) mit Serumamylasewerten von über 200 SE (Somogi-Einheiten) aufwiesen.

Die Zuordnung der Patienten zu den einzelnen Diagnosen wurde nach Durchsicht der abgeschlossenen Krankengeschichten vorgenommen. Die insgesamt 190 Patienten wurden in acht Gruppen eingeteilt, wie aus Tabelle I und Abbildung 17 - 26 zu entnehmen ist.

Tabelle I :

Jeder hier aufgeführte Patient erscheint nur mit seiner Hauptdiagnose in der Tabelle. Bei mehreren Diagnosen rangiert z.B. die Diagnose aus Gruppe 1 vor der Diagnose aus Gruppe 3 u.s.w.

Gruppe	Erkrankung	Anzahl der Patienten
1	Akute Pankreatitis	46
2	Chronische Pankreatitis	10
3	Cholelithiasis und Choledocholithiasis	10
4	Alkoholabusus	11
5	Leberzirrhose	8
6	Chronische	39
	Akute	7
	Niereninsuffizienz	
7	Diabetes mellitus	12
8	Sonstige Erkrankungen	47

Tabelle II :

Hier werden Patienten aufgeführt, bei denen auf Grund ihrer Anamnese und ihrer Untersuchungsbefunde ein dringender Verdacht auf Pankreasbeteiligung besteht. Dieser Verdacht wurde aber nicht bei der Diagnose berücksichtigt.
(Grundlage : Krankengeschichten)

Gruppe	Erkrankung	Anzahl der Patienten
1	Gallenwegserkrankung	9
2	Leberzirrhose	3
3	Diabetes mellitus	3
4	Niereninsuffizienz	1
5	Sonstige Erkrankungen	11

2. Methoden zum Nachweis einer Makroamylase

A. Gelfiltration

Als Anleitung diente uns eine Arbeit von FRIDHANDLER L. und Mitarbeitern (19).

a) Materialien

Puffer :

Tris-Puffer 50 mmol

Natriumchlorid 8,5 g

Natriumazid 0,2 g

Bis auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

pH 7,2

Sephadex G-100

Für die Arbeit erschien uns das Sephadex G-100 gut geeignet, da es in dem Molekulargewichtsbereich der Makroamylase (MG 100 000 - 150 000) eine gute Trennung aufweist und eine relativ schnelle Durchflußgeschwindigkeit hat (52).

Sephadex G-100 wird im Überschuß in dem Puffer gelöst. Es quillt für ca. drei bis vier Tage bei Zimmertemperatur. Anschließend wird es zum Packen der Säule verwendet.

Mikrosäule :

Die benutzte Säule hat einen inneren Durchmesser von 9 mm und eine Höhe von 150 mm (K 9/15, Pharmacia) (52).

Diese Säule zeichnet sich durch ein besonders kleines Ausflußvolumen (= Totraumvolumen zwischen

dem Ende der Gelsäule und dem Ausflußstutzen)
von weniger als 0,1 % des Säulenvolumens aus.

Die zunächst in den Vorversuchen verwendete Säule hatte ein wesentlich größeres Totraumvolumen, verursacht durch einen Glashahn. Darin mischten sich bereits getrennte Volumina wieder und erlaubt keine genaue Trennung der aufgetragenen Proben mehr.

Ein Nachteil der Säule mit besonders kleinem innerem Durchmesser ist der sogenannte "Wandeffekt", der sich zwischen der zu trennenden Probe und der Säulenwand bilden kann (52). Die Proben zeigen dann keine deutlichen Trennungsbanden, sondern zum Rande hin Schlieren, die durch eine schnellere Fließgeschwindigkeit in der Mitte und einen Brems-effekt am Rande der Säule hervorgerufen werden.

Dieser Effekt läßt sich durch eine nicht zu hohe Durchflußgeschwindigkeit, ein Wechseln des Gels beim Auftreten der Schlieren und ein sorgfältiges Packen und Einlaufen der Säule, bevor sie zur eigentlichen Trennung benutzt wird, vermeiden.

Markierlösungen :

Als Markierlösung wurden Cytochrom c pro analysi (MG 13500) und Blue Dextran 2000 der Firma Pharmacia (MG 150 000) verwendet.

Ein Gemisch der beiden Substanzen diente uns zunächst als Kontrolle für die Trenneigenschaften der

Säule. Auf Grund des Molekulargewichtes mußte im Eluat zuerst das Blue Dextran als reine Fraktion erscheinen und danach das Cytochrom c. Die Spektren von Cytochrom c und Blue Dextran 2 000 wurden in einem Doppelstrahlphotometer gemessen. Die Maxima lagen bei 525 nm für Cytochrom c und 620 nm für Blue Dextran 2 000. Die einzelnen Fraktionen wurden bei den jeweiligen Wellenlängen gemessen und in einem Diagramm aufgetragen (siehe Abb. 1).

Die zu untersuchenden Serumproben wurden mit dieser Markierlösung gemischt. Im Eluat mußte dann auf Grund der ähnlichen Trenneigenschaften eine eventuelle Makroamylase mit dem Blue Dextran in den gleichen Fraktionen erscheinen (19, 52). Ein entsprechend paralleles Verhalten zeigen die normale Serumamylase und das Cytochrom c.

b) Füllen der Säule :

Nachdem das Gel in der Pufferlösung im Überschuß gequollen war, wurde es mit einer großlumigen Pipette bei geöffnetem Ausfluß in die Säule gefüllt. Die Suspension floß langsam und kontinuierlich an der Säulenwand hinunter, bis das Gel die gewünschte Höhe, in unserem Fall ca. 12 cm, erreicht hatte. Anschließend wurde die Säule mit 1/2 bis 1 Liter der Pufferlösung durchspült, wobei sich das Gel auf ca. 10-11 cm gesetzt hatte.

Die Auftragstelle der Gelsäule wurde dann mit einem Schaumstoffplättchen bedeckt, um ein Aufwirbeln des Gels und damit unsaubere Banden beim Auftragen der Proben zu vermeiden.

Die Homogenität der Gelsäule wurde durch einen Probedurchfluß mit Blue Dextran 2 000 überprüft.

c) Nachweis der Amylase im Eluat :

Zur quantitativen Bestimmung der Amylase in den einzelnen Fraktionen wurden folgende Verfahren angewendet :

1. Phadebas-Amylasetest (16)
2. Dinitrosalicylsäure (zum Amylasenachweis im pankreassaft verwendet) (16)

Diese Tests erwiesen sich für die geringe Amylaseaktivität in den bei der Sephadex Gelfiltration erhaltenen Fraktionen als zu unempfindlich.

Als semiquantitative Methoden wurde dann eine Jodstärkereaktion mit

1. Sulkofski-Stärke
2. Amylose

getestet, wobei sich die Reaktion mit Amylose als besonders günstig erwies, da nur hierbei eine Entfärbung zu beobachten war, nicht aber mit der Sulkofski-Stärke (16, 19, 45).

d) Versuchsdurchführung :

Eine Mischung von 200 u l Serum und 20 u l Markierlösung (bei Patientenserum mit Aktivitäten unter 1 000 IE) beziehungsweise 100 u l Serum und 10 u l Markierlösung (bei Patientenserum mit Aktivitäten über 1 000 IE) wurde vorbereitet. Nachdem der Pufferüberstand in der Säule durchgelaufen war, wurden

200 u l (100 u l) der Probe auf das Schaumstoffplättchen mit einer Eppendorfpipette aufgetragen. War die Probe in dem Plättchen verschwunden, wurde mit 100 ul Puffer nachgespült und anschließend wurde die Säule an ein Pufferreservoir angeschlossen. Die Tropfgeschwindigkeit betrug ca. 3-5 Tropfen pro Minute. Sobald das Blue Dextran nach 6-10 Minuten den Auslauf der Gelsäule erreichte, wurden Fraktionen zu jeweils 9 Tropfen aufgefangen (ca. 60 ul/Fraktion). Das Blue Dextran war deutlich in der 6.-10. Fraktion zu erkennen, während das Cytochrom c erst in der 13. Fraktion im Eluat erschien.

Jede Fraktion wurde mit 100 ul der Amyloselösung versehen und für 30 Minuten bei 37° C in einem Wasserbad inkubiert. Die Reaktion (Spaltung der Amylose durch die Amylase) wurde dann mit 1,7 ml der Jodlösung gestoppt. Die restliche ungespaltene Amylose ergab mit der Jodlösung eine Blaufärbung, so daß Fraktionen mit einer hohen Amylaseaktivität eine Violett- oder Blaufärbung, dann eine Orangefärbung bis zur Eigenfarbe des Jods aufwiesen, während geringe oder fehlende Aktivitäten in den Fraktionen durch eine intensive blaue Jodstärkereaktion gekennzeichnet waren. In diesen Fraktionen waren kleine Partikel (Jodstärkekompexe) sichtbar. Extinktionen wurden photometrisch bei 625 nm in einem Eppendorphotometer gemessen. Aufgrund der mitgemessenen Trübungen sind die Messungen in den Fraktionen mit Partikeln als semiquantitativ anzusehen.

Soll diese Methode als Suchtest für Makroamylase bei einem großen Patientenkollektiv eingesetzt werden,

reichen die sechste bis zehnte Fraktion zum Nachweis aus, da nur hier mit einer Makroamylase zu rechnen ist.

e) Auswertung der Vorversuche :

Zur Anwendung der Gelfiltration als Suchtest für ein großes Patientenkollektiv wurden vier Säulen entsprechend der bisherigen Anleitung vorbereitet und durch mehrmaliges Durchlaufen der Säulen mit normalem Patientenserum geeicht. Die erhaltenen Diagramme waren bei den Säulen im wesentlichen identisch :

6. - 10. Fraktion	nur Blue Dextran
11. - 12. "	kein Indikator
13. - 22. "	Cytochrom c und normale Serumamylase

Zusätzlich zur Amylaseaktivitätsbestimmung wurden in den Fraktionen die Serumproteine bei 280 nm in einem Zeiß-Spektralphotometer in Halbmikroküvetten von 1 cm Schichtdicke gegen Luft gemessen. Hierbei ergab sich ein hoher Globulin-Gipfel in der 9.-11. Fraktion mit steil ansteigendem und langsam abfallendem Schenkel und ein zweiter wesentlich niedriger Albuminpeak mit einem Maximum in der 30. Fraktion (Abb. 2).

f) Diskussion der Methode :

Bei dieser Methode muß, um eine gute Trennschärfe zwischen den Amylasefraktionen zu erhalten, das Totraumvolumen sowohl beim Auftragen der Proben, als auch beim Ausfluß des Eluats so gering wie möglich gehalten werden (7, 17, 18, 20, 35, 68). Dies war uns nach anfänglichen Schwierigkeiten

im Verlaufe der Vorversuche gelungen.

Die Breite des Elutionsprofils werden durch folgende Faktoren verändert :

1. Durch die Menge der Serumprobe: Je größer das Verhältnis Probe zu Säulenvolumen ist, desto breiter wird das Elutionsprofil und desto unschärfer die Auftrennung. Die Probe muß aber noch groß genug sein, um eine sichere und deutliche Nachweisreaktion zu geben.
2. Durch die Höhe der Amylaseaktivität im Serum: Die Auswirkungen entsprechen denen der unterschiedlichen Mengen der Serumproben unter 1.
3. Durch die Konzentration der Amyloselösung : Hochkonzentrierte Lösungen ergeben nach der Jodstärkereaktion eine so dunkle Färbung, daß bei einer relativ geringen Amylaseaktivität der einzelnen Fraktionen ein Unterschied in der Aktivität in den Fraktionen nicht mehr feststellbar ist.
4. Durch die Inkubationszeit :
Bei geringer Inkubationszeit (z.B. 10 Minuten, wie in der Literatur angegeben (19)) werden die Diagramme bei Ausschaltung der obigen Fehlerquellen schmaler, d.h. die Trennung schärfer. Dadurch können aber unter Umständen geringe Makroamylaseaktivitäten in der ersten Fraktion übersehen werden. Daher entschlossen wir uns nach Austestung zu einer 30-minütigen Inkubation, wodurch wir sowohl eine gute Trennung der Amylasefraktionen erwarten als

auch sicher sein konnten, daß wir keine Makroamylasämie übersehen würden.

Weiterhin mußte als etwaige Fehlerquellen eine Interaktion der Proteine mit dem Jodstärkekomplex in den ersten Fraktionen berücksichtigt werden. Bei Seren mit besonders hohem Proteinanteil trat eine leichte Verfärbung (grau-gelb) in den Makroamylasefraktionen auf, die aber deutlich von der Makroamylaseämieentfärbung zum einen durch die Farbe (violett-orange bei Makroamylasämie), zum anderen durch deutlich sichtbare große Partikel bei den Fraktionen mit hohem Proteinanteil zu unterscheiden waren.

B. Dünnschichtchromatographie (44, 49, 51, 71)

a) Substanzen (49)

Dünnschichtchromatographieapparat der Firma Pharmacia. Ausmaße der Chromatographieplatten : 20 cm x 20 cm.

Sephadex G-200 Superfine der Firma Pharmacia.
Zubereitung : 4 g Sephadex G-200 ad 125 ml Puffer.
Quellungszeit : 3 Tage bei Raumtemperatur.

Pufferlösung mit Substrat für Amylase :
Dinitrohydrogenphosphat 13,3 g
Benzoessäure 4,3 g
Ad 250 ml mit Aqua dest. auffüllen und die Lösung aufkochen.

1 g Stärke (löslich von MERCK) in 5 ml Aqua dest.
anrühren, zur obigen Pufferlösung hinzukippen,
eine Minute kochen und dann abkühlen lassen.
Anschließend mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen.

Jodlösung zur Entwicklung der Platten :

Konzentrierte Jodlösung :

Kaliumjodat 356 mg

Kaliumjodid 4,5 mg

Aqua dest. 80 ml

Konzentrierte Salzsäure 0,9 ml

Langsam mischen und mit Aqua dest. auf 100 ml
auffüllen.

Verdünnung der Jodlösung:

Wasserfreies Kaliumfluorid 25 g

Aqua dest. 350 ml

Konzentrierte Jodlösung 50 ml

Mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen.

Markierlösung :

Gemisch aus Blue Dextran 2 000 (5 mg/ml) und
L-DNP-Alanin (0,1 mg/ml).

Filterpapierstreifen (Whatman 3MM) Ausmaße :

20 cm x 3 cm.

b) Versuchsdurchführung (49)

Auf eine Glasplatte wurde eine Gelschicht von
0,6 mm Dicke aufgetragen. Die Konsistenz des Gels
war dünner als in der Anleitung von der Firma
Pharmacia angegeben. Mit Filterpapierstreifen
wurde die Platte mit den Pufferreservoirs (oberes
Reservoir 75 ml, unteres 25 ml) verbunden und in
einem Winkel von 10 Grad zur Horizontalen für
mindestens fünf Stunden equilibriert. Anschlie-
ßend wurden auf die horizontalen Platten die Proben

mit einer 10 μ l Eppendorfpipette vorsichtig aufgetragen (das Gel darf nicht berührt werden). Am Rande wurde zusätzlich eine Probe der Markierlösung aufgetragen. Unter experimentellen Bedingungen hatte ein solcher Klecks einen Durchmesser von weniger als 1,5 cm, so daß neun Proben, einschließlich Markierlösung, aufgetragen werden konnten.

Die Platte wurde wieder in einen Winkel von 10 Grad geneigt und für 3 Stunden laufen gelassen, nachdem das obere Pufferreservoir nachgefüllt worden war. Nach der Laufzeit war das Blue Dextran, in dessen Bereich auch eine eventuell vorhandene Makroamylase sein mußte, ca. 8-9 cm auf der Platte gelaufen und das L-DNP-Alanin mit der normalen Serumamylase ca. 3 cm. Die Platte wurde von den Pufferreservoirs getrennt, mit der Jodlösung besprüht und photographiert. Es ist wichtig, die Platte horizontal zu halten, da sich sonst die aufgetragenen Substanzen vermischen. An den Stellen, an denen eine Amylaseaktivität nachweisbar war, entstand ein heller Fleck, während der Rest der Platte dunkelblau gefärbt war. (Abb. 10).

C. Ultrazentrifugation (59, 66)

a) Dichtegradient

Mit einem TRIS-Puffer (siehe Gelfiltration) wurde je eine 10%ige und eine 50%ige Saccharoselösung hergestellt. Als Gradientenmischer dienten uns zwei in einen Kunststoffblock gefräste Höhlen, die nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren miteinander

verbunden waren und einen gemeinsamen Abfluß hatten.

Die hintere Röhre wurde mit 2 ml 50%iger, die vordere mit 2 ml 10%iger Saccharoselösung gefüllt. In der vorderen Röhre wurden beide Lösungen vermischt und mit einem Schlauch, der den Boden der Zentrifugenröhrchen berührte, in die Polyäthylenröhrchen (Volumen 5 ml) geleitet. Auf diese Weise wurde ein von oben nach unten kontinuierlich abnehmender linearer Dichtegradient gebildet.

b) Versuchsdurchführung :

Auf den Dichtegradienten wurden 100 μ l der zu untersuchenden Probe aufgetragen. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit einem SW 65 Titanrotor in einer Ultrazentrifuge der Firma Beckmann bei 40 000 rpm (116 4000 g) und 4° C für 16 Stunden laufen gelassen. Anschließend wurden die Röhrchen mit einer 12^{er} Kanüle am Boden angestochen, und es wurden Fraktionen zu jeweils 5 Tropfen aufgefangen. Der Nachweis der Amylase erfolgte mit der gleichen Jod-Stärke-Reaktion, die bereits bei der Gel-filtration angegeben wurde.

Ein Probelauf mit einem Gemisch aus Blue Dextran und Cytochrom c ergab eine gute Trennung der beiden Substanzen (unten Blue Dextran, oben Cytochrom c). Ein Vermischen der Banden beim Fraktionieren wurde nicht festgestellt.

D. Elektrophorese (11, 12, 26, 48)

a) Materialien

Die Elektrophorese wurde auf Cellogelelestriefen der Firma Sartorius durchgeföhrt.

Zur Trennung der Amylase in die Isoenzyme erwies sich das diskontinuierliche Tris-Barbiturat-Puffersystem von KOHN, J. (37) als am besten geeignet.

Anode : 0,26 Tri-Puffer, pH 9,1
Tris 25,2 g
EDTA 2,5 g
Borsäure 1,9 g
Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Kathode : Barbituratpuffer, pH 8,6
Na-Diäthylbarbiturat 5,16 g
Diäthylbarbitursäure 0,92 g
Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Die Elektrophorese wurde in einer Beckmann-Elektrophoreseleammer, in der gleichzeitig sechs Seren untersucht werden konnten, durchgeföhrt.

Zum Nachweis der Isoamylasen diente uns ein modifizierter Phadebas-Amylasetest (48) :

0,5 g Agar (Difco-Nobel) wurden in 25 ml Aqua dest. in heißem Wasserbad geschmolzen. Acht Phadebas-Tabletten wurden in einem Mörser zu Pulver verrieben, in die geschmolzene Agarlösung gekippt, aufgekocht und in eine Schale gegossen.

In einer solchen feuchten Kammer konnte das Gel für längere Zeit aufbewahrt werden.

b) Versuchsdurchführung

Die Cellogelstreifen wurden in einem Gemisch des oben beschriebenen diskontinuierlichen Puffersystems (50 ml Tris-Puffer, 50 ml Barbituratpuffer) für ca. 15 Minuten eingeweicht und anschließend in die Elektrophoresekammer eingespannt. In unseren Vorversuchen erreichten wir die besten Trennungen, wenn die Serumproben 1,5 cm - 2 cm von der Anode entfernt mit einem Stempel aufgetragen wurden.

Dann wurde für 90 Minuten ein konstanter Strom von 0,6 - 0,7 mA/cm Cellogelstreifen bei einer Raumtemperatur von 4° C angelegt. Anschließend wurden die Streifen in eine bereits auf 37° C erwärmte feuchte Kammer mit dem Phadebas-Agar-Gemisch für 30 Minuten so gelegt, daß sich keine Luftbläschen zwischen beiden Schichten befanden. Die von dem Phadebas durch die Amylase abgetrennten blauen Farbpartikel diffundierten in die Cellogelstreifen und ergaben dort deutlich blaue Banden. Nachdem die Streifen an der Luft getrocknet waren, wurden sie densitometrisch gemessen (Abb. 12).

Bei der Durchführung der Elektrophorese mußten folgende Punkte besonders beachtet werden :

1. Die unterschiedlichen Amylaseaktivitäten der Patientenserum mußten beim Auftragen der Serum-mengen berücksichtigt werden. Serum mit Aktivitäten unter 800 IE wurden zweimal, Serum mit Aktivitäten über 800 IE nur einmal mit dem Stempel aufgetragen.

2. Bei höheren Amylaseaktivitäten (über 1500 IE) muß zusätzlich die Inkubationszeit bei der Entwicklung auf 15-20 Minuten verkürzt werden. Andernfalls verwischen die Banden, und zwei getrennte werden nur noch als eine breite Bande wahrgenommen.

c) Variationen der Versuchsdurchführung

1. Zur Trennung der Amylase in die Isoamylasen :
- Durchgeführte Trennungen auf normalen Celluloseacetatfolien ergaben schlechtere Trennungsbanden als die Trennungen auf Cellogelstreifen.
 - Ein Einweichen der Cellogelstreifen in einer Albuminlösung (11) verschlechterte das Ergebnis. Einen protektiven Effekt des Albumins auf die Amylase und eine verbesserte Trennung und Farbreaktion konnten wir nicht nachweisen.
 - Elektrophoresen mit einem 0,01 M Barbituratpuffer von pH 8,6 ergaben ebenfalls schlechtere Ergebnisse, als das von KOHN, J. (37) angegebene Verfahren.
 - Versuchsläufe konstanter Spannung von 300 V Gleichstrom, bzw. 400 V pro 1 Stunde Laufzeit verbesserten die Ergebnisse nicht.
2. Ein anderes Verfahren zum Nachweis der aufgetrennten Isoamylasen mit einem 0,2 M Trispuffer (pH 7,4), der 0,5 mg lösliche Kartoffelstärke pro 100 ml enthält und einer Jodlösung, wurde von HEDGAR, R.W. et al. angegeben (26). Bei unseren Versuchen konnten wir jedoch mit dieser Methode keine Banden nachweisen.

3. Enzymbestimmungen

Bei den Patienten wurden folgende Werte untersucht:

- a. Amylase im Serum und Urin
- b. Kreatinin im Serum und Urin.

Ad a.:

Zur Enzymbestimmung wurde der Phadebas-Amylasetest der Firma Pharmacia verwendet.

Hierbei handelt es sich um blaue Farbstoffgruppen (Chromophore), die über kovalente Bindungen an ein Stärkopolymer gebunden sind und somit ein unlösliches blaues Stärkederivat bilden. Die alpha-Amylase hydrolysiert das blaue Stärkopolymer zu wasserlöslichen Spaltprodukten. Das Ausmaß der Substrathydrolyse hängt von der Amylaseaktivität der zugesetzten Probe ab. Die dadurch bedingte Blaufärbung wird photometrisch bestimmt und die Extinktionswerte der Probe anhand einer Standardkurve in mU/ml umgewandelt.

Für die Aktivität der alpha-Amylase in Serum und Urin bei 37° C gelten folgende Normalbereiche (16)

Serum : 70 - 300 IE/ml

Urin : 100 - 2000 IE/ml

Ad b.:

Die Kreatininbestimmung wurde mit alkoholischer Pikrinsäure (Jaffé-Reaktion) im Technicon-Autoanalyzer durchgeführt.

c. Aufbewahrung der Seren :

Die Serumproben, die zum Nachweis einer Makroamylasämie dienten, wurden bei -10° C eingefroren.

Die Untersuchung erfolgte durchschnittlich 4 - 8 Wochen später. In Vorversuchen wurde ein größerer Aktivitätsverlust in dieser Zeit ausgeschlossen. Eine Neubestimmung der Aktivität bei 10 Seren nach 11 Monaten ergab einen durchschnittlichen Aktivitätsverlust von 20 % - 52% ($\bar{M} = 26 \%$) (Tab. III).

Tabelle III

Amylaseaktivitätsverlust in 10 Seren innerhalb von 11 Monaten : $\bar{M} = 26 \%$

Erstbestimmung der Serumamylaseaktivitäten IE/ml	Nachbestimmung der Aktivitäten 11 Monate später IE/ml	Aktivitäts- verlust in %
320	260	19
400	310	22
305	265	13
340	275	19
430	305	29
520	250	52
330	230	29
800	600	25
760	610	20
540	420	22

4. Quotient Amylaseclearance / Kreatininclearance

Der Quotient wurde nach folgender Formel errechnet (13, 40, 43, 53, 67) :

$$C_{Am} = \frac{\text{Amylasekonzentration im Urin}}{\text{Amylasekonzentration im Serum}} \times \frac{V}{T}$$

$$C_{Kr} = \frac{\text{Kreatininkonzentration im Urin}}{\text{Kreatininkonzentration im Serum}} \times \frac{V}{T}$$

$$C_{Am}/C_{Kr} = \frac{[Am]_{Urin} \times [Kr]_{Serum}}{[Am]_{Serum} \times [Kr]_{Urin}} \quad (\times 100)$$

(%)

V = Volumen

T = Zeit

C = Clearance

Wie aus der Formel zu ersehen ist, ist ein Sammelurin über einen bestimmten Zeitraum nicht notwendig, da in der Gleichung das Urinvolumen und die Zeit nicht mehr auftreten. Die Normalwerte für den Quotienten lagen zwischen 0,01 und 0,04 oder in Prozent ausgedrückt zwischen 1 % und 4 % (43).

III. E r g e b n i s s e

=====

1. Gelfiltration

a) Elutionsprofile

Mit dieser Methode gelang es uns, unter Ausschluß aller Fehlerquellen, in unserem Patientenkollektiv von 190 Patienten drei Fälle mit einer Makroamylasämie nachzuweisen.

Bei diesen Seren zeigte sich im Bereich des Blue Dextran 2000 und der großmolekularen Proteine (Globuline) eine deutliche Amylaseaktivität über drei bis vier Fraktionen. Dieser erste Peak der Makroamylase wurde von einem zweiten breiteren, der die normale Serumamylase darstellt, im Bereich des Cytochrom c gefolgt (Abb. 3, 5, 7).

Die Makroamylase war bei allen Seren dieser Patienten über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Die Untersuchung wurde auch mit verschiedenen Säulen durchgeführt, um den Defekt einer Säule als etwaige Fehlerquelle auszuschließen.

Den endgültigen Beweis einer Makroamylasämie, wie sie von BERK, J.E. et al. (9) beschrieben wurde, lieferte uns die Untersuchung des Urins dieser Patienten mit der gleichen Methode. Die Urine wurden mit einer Ultrahülse (Poren undurchlässig für Amylase) auf die Hälfte ihres Volumens eingengt und unter den gleichen Versuchsbedingungen wie das Serum durch die Säule filtriert.

Im Eluat konnte im Bereich des Blue Dextran 2000 keine Amylaseaktivität nachgewiesen werden, und das Elutionsprofil wies auch nur einen Peak im Bereich der normalen Serumamylase auf (Abb. 4,6).

Der Anteil der Makroamylase an der gesamten Amylaseaktivität schwankte bei den Patienten über einen Zeitraum von 2-3 Monaten zwischen 75 % und 10 %. Diese Zahlen wurden aufgrund des Verhältnisses der beiden Flächenintegrale des Elutionsprofils zueinander geschätzt (Abb. 8,9).

b) Krankengeschichten der Patienten mit Makroamylasämie

Patient Sch., A. 48 Jahre :

Im zweiten Weltkrieg Schußverletzung der linken Hüfte, 1947 Osteomyelitis mit anschließender Hüftgelenkstuberkulose in dem gleichen Gelenk. 1951 Arthrodesse links. 1954 und 1971 Ulcus duodeni.

Seit Herbst 1974 stärkere Schmerzen im Bereich der LWS. Am 12.4.1975 Aufnahme in ein auswärtiges Krankenhaus wegen Schmerzen in der Lendenregion, und wegen leicht druckschmerzhafter Nierenlager. In den darauffolgenden Tagen kam es zu einem Hb-Abfall, Thrombozytopenie und Abfall des Quickwertes, so daß der Patient am 14.4.1975 unter der Verdachtsdiagnose Verbrauchskoagulopathie in die Marburger Universitätsklinik eingeliefert wurde.

Die klinische Untersuchung ergab an pathologischen Befunden : RR 150/100 mm Hg, Puls 110/Minute, meteoristisch gespannte Bauchdecken, spärliche

Darmgeräusche, diffuser Druckschmerz in Mittel- und Unterbauch und in die Nierenlager ausstrahlend, beide Nierenlager hochgradig klopfempfindlich, Rektal dunkelrotes Blut am Fingerling.

Laborwerte : BSG 118/150 mm n.W.; Hb 10,7 g %; Ery 3,51 Mill./mm³; HK 31,5 %; Leukozyten 8700/mm³; Differentialblutbild : 30 Stabkernige, 50 Segmentkernige, 18 Leukozyten, 2 Monozyten; Serum-Kreatinin 1,1 mg %; Harnstoff 50 mg %; Bilirubin 1,2 mg %; GOT 26 mU/ml; GPT 10 mU/ml; Cholesterin 237 mg %; Triglyceride 343 mg %; alkalische Phosphatase 80 mU/ml; GEW 6,1 g %; Elektrophorese 51/7/8,9/13,3/14,7 rel. %; Urin : EW pos., Sediment : Bakterien, 3-6 Leukozyten, reichlich Erythrozyten. Amylase (IE/ml) Serum / Urin : 490/3800, 730/3400, 1060/2800, 490/2700, 460/1520, 620/1100, 380/600, 470/4200.

Sternalpunktion : Massive Metastasierung eines soliden Tumors (keine Klassifizierung). Röntgenologisch und szintigraphisch multiple Knochenmetastasen.

Diagnose :

1. Knochenmetastasen bei unbekanntem Primärtumor
2. Verdacht auf kleines präpylorisches Ulcus ventriculi.

Das Vorhandensein einer Makroamylase wurde am 16.4.1975 festgestellt. Bei dem Patienten wurde eine zytostatische Therapie (Vincristin, Adriablastin) unter gleichzeitiger Gabe von Blutkonserven und Thrombozytenkonzentrat eingeleitet. Nach vorübergehender Besserung ist der Patient am 27.8.1975

im Herz- und Kreislaufversagen gestorben.

Obduktionsbefund : Massive Metastasierung in Knochen, Lunge, Leber, paraaortale Lymphknoten, Niere, Kleinhirn.

Primärtumor : kleinzelliges Bronchialcarcinom.

Patient Sch., B. 61 Jahre :

1937 Lungenentzündung, 1940 entzündliche Nieren-
erkrankung. Seit 1966 wegen beginnender Urämie
behandelt. 1972 Einweisung des Patienten wegen
"Herzanfall" mit Blutdruckanstieg (systolisch
bis 220 mm Hg) in ein auswärtiges Krankenhaus.
Anschließend wurde der Patient wegen chronischer
Niereninsuffizienz in die Marburger Universitäts-
klinik eingewiesen, wo eine Hämodialysebehandlung
eingeleitet wurde.

Diagnose :

1. Renale Hypertonie mit Fundus hypertonicus
2. Chronische Niereninsuffizienz

Therapie : diätetisch, Antihypertensiva, Digitalis,
Aludrox, Hämodialyse.

Seit dem 26.4.1973 wird der Patient regelmäßig
zweimal wöchentlich dialysiert. Am 3.6.1975 wurde
bei dem Patienten die Makroamylasämie festgestellt.

Laborwerte : Kreatinin 12,0 mg %; Harnstoff 184 mg %;
Harnsäure 8,4 mg %; Elektrophorese 56,1/3,7/10,3/9,4/
20,4 rel. %; GEW 6,8 g %; Ery 3,6 Mill./mm³; Hb
7,8 g %; HK 424 %.

Amylasewerte (IE/ml) Serum/Urin: 400/39, 335/40,
308/70, 385/65.

Patient Z., K.-H., 51 Jahre :

Bei dem Patienten ist seit Jahren ein chronischer Alkoholabusus bekannt. Fünf vergebliche Entziehungskuren wurden durchgeführt. 1946 erkrankte der Patient an Syphilis.

Nach Angaben des Patienten wurde er 11 mal in der Frankfurter Universitätsnervenklinik wegen Erregungszuständen im Rausch und Suicidabsichten unter Alkoholeinfluß behandelt. 1967 schwere Alkoholintoxikation. 1968 wurde nach Biopsie eine Lebercirrhose festgestellt. Vom 16.12.1974 bis 11.4.1975 wegen schwerem Leberkoma und coronarer Mangel durchblutung behandelt. Am 20.6.1975 wurde der Patient mit einer Alkoholintoxikation während eines Kuraufenthaltes in die Marburger Universitätsklinik eingeliefert. Hier wurde dann eine Makroamylase festgestellt. Am 21.6.1975 wurde der Patient auf eigenen Wunsch entlassen.

Laborwerte : GOT 21 mU/ml, GPT 20 mU/ml; Amylase
480 IE/ml

Diagnose :

1. Akute Alkoholintoxikation
2. Lebercirrhose bei chronischem Alkoholabusus
3. Verdacht auf Oesophagusvarizen
4. leichte Begleitpankreatitis
5. Verdacht auf Harnwegsinfekt

2. Dünnschichtchromatographie

Bei der Serienuntersuchung der Patientenserum stellte sich heraus, daß die Dünnschichtchromatographie in dieser methodischen Durchführung zum Nachweis einer Makroamylase nicht geeignet war.

Während säulenchromatographisch die Makroamylase einwandfrei nachgewiesen wurde, konnte bei der Dünnschichtchromatographie auf den Platten im Bereich des Blue Dextran 2000 mit dem gleichen Patientenserum keine Makroamylaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 10).

Daraufhin wurden folgende Variationen dieser Methode vorgenommen :

1. Versuchsdurchführung mit Sephadex G-100
2. Versuchsdurchführung mit Puffer ohne Stärke.
Sie wurde erst vor der Entwicklung mit der Jodlösung auf die Platte gesprüht. Anschließend wurde die Platte für 15 Minuten bei 37° C inkubiert und dann entwickelt.

Beide Versuche erbrachten keine besseren Ergebnisse für die Dünnschichtchromatographie.

3. Ultrazentrifugation

Die Durchführung dieses Versuches mit den drei Makroamylaseseren und einem Kontrollserum ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben.

Die Auftrennung der Amylase in zwei deutlich zu unterscheidende Fraktionen, wie es auf Grund des unterschiedlichen Molekulargewichtes der Makro- und normalen Amylase zu erwarten wäre, gelang nicht. Stattdessen zeigten zwei der Makroamylaseseren einen Anstieg der Amylaseaktivität in den Fraktionen, die dann langsam abfiel, aber den Ausgangswert nicht mehr erreichte. Das Kontrollserum und das dritte Makroamylaserum ergaben eine eingipfelige Kurve mit einem identischen auf- und absteigenden Schenkel (Abb. 11).

4. Elektrophorese

Mit dieser Methode erreichten wir eine Auftrennung der Serumamylase in zwei bis vier Banden, die die einzelnen Isoenzyme darstellten. Die Bande der Pankreasamylase befand sich vor der der Speichalamylase (48).

Es wurde eine Gruppe von 30 Patientenseren untersucht, die sich folgendermaßen zusammensetzte :

Akute und chronische Pankreatitis	12
Lebercirrhose	3
chronische Niereninsuffizienz	10
sonstige Erkrankungen	5
Patienten mit Makroamylase	3

Die Auftrennung, die wir erhielten, ergaben für die einzelnen aufgeführten Krankheitsbilder kein

charakteristisches Isoamylasenmuster. Auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Makroamylasämiefällen einerseits und den anderen Erkrankungen andererseits konnten wir nicht feststellen.

Die zusätzliche Densitometrie der Cellogelstreifen erbrachte keine Verbesserung der Ergebnisse (Abb. 13-16).

5. Quotient Amylaseclearance/Kreatininclearance

Nach der oben angegebenen Formel wurde bei jedem der 190 Patienten der Quotient aus Amylaseclearance zu Kreatininclearance gebildet und entsprechend der Gruppenzugehörigkeit der Patienten in ein Diagramm eingetragen (Abb. 21, 22). Die Tabelle IV gibt eine Übersicht über diese Werte.

Der Mittelwert von allen Patienten lag bei 0,0458 oder 4,85 %. Bei den Patienten mit Makroamylasämie lag der Quotient zwischen 0,004 (0,4 %) und 0,6 (6,0 %), der Mittelwert bei 0,029. Wie aus der Abbildung 21 und 22 zu entnehmen ist, liegt der Quotient in annähernd 15 % der Fälle unter 0,01 und in 42 % über 0,04.

Außerdem wurde der Quotient Amylaseclearance / Kreatininclearance von allen Patienten mit einer Niereninsuffizienz in Abhängigkeit von Serumkreatinin in ein Koordinatensystem eingetragen (Abb. 25). Mit den Werten errechneten wir eine signifikante Korrelation von 0,426. Das bedeutet, daß mit zu-

nehmender Nierenfunktionseinschränkung der filtrierte Anteil der Serumamylase ansteigt. Die Clearance der Serumamylase wird also relativ nicht so stark beeinträchtigt wie die Kreatininclearance.

In Abbildung 26 wurden die Quotienten der Patienten mit akuter Pankreatitis, deren Serumamylasewerte deutlich erhöht waren (über 1000 IE/ml) in Abhängigkeit von den Serumamylasewerten aufgetragen. Die Werte in dem Diagramm streuen so unsystematisch, daß hier mit keiner signifikanten Korrelation zu rechnen ist.

Tabelle IV

Übersicht über die Lage des Quotienten
Amylaseclearance zu Kreatininclearance
in unserem Patientenkollektiv.

Patientengruppe	$C_{AM}/C_{KR} \%$ Niedrigster - höchster Wert	Niedrigster - höchster Serum- amylasewert IE/ml	Mittelwert von C_{AM}/C_{KR} %
Akute Pankreatitis	0,5 - 20,2	315 - 3600	5,37
Chronische Pankreatitis	1,15 - 4,5	260 - 990	2,43
Cholelithiasis Choledocholithiasis	0,4 - 10,5	200 - 800	4,63
Alkoholabusus	0,7 - 3,45	220 - 570	2,1
Leberzirrhose	0, - 2,5	250 - 600	1,5
Chronische, akute Nieren- insuffizienz	0,4 - 46 2,65 - 58	190 - 3000 190 - 1100	4,8 15,4
Diabetes mellitus	0,3 - 12	320 - 580	4,6
Sonstige Erkrankungen	0,15 - 10	150 - 1200	2,98
Patienten mit Serumamylase- werten unter 300 IE/ml	0,2 - 7,85		2,56

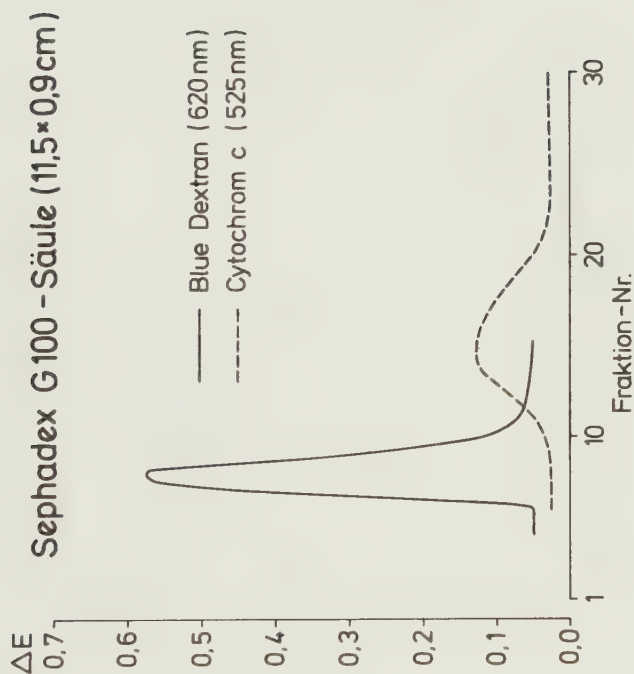


Abb. 1:

Elutionsprofil der Markiersubstanzen Blue Dextran 2000 (Bereich, in dem eine Makroamylase filtrierte wird) und Cytochrom c (Bereich, in dem die normale Amylase erscheint).

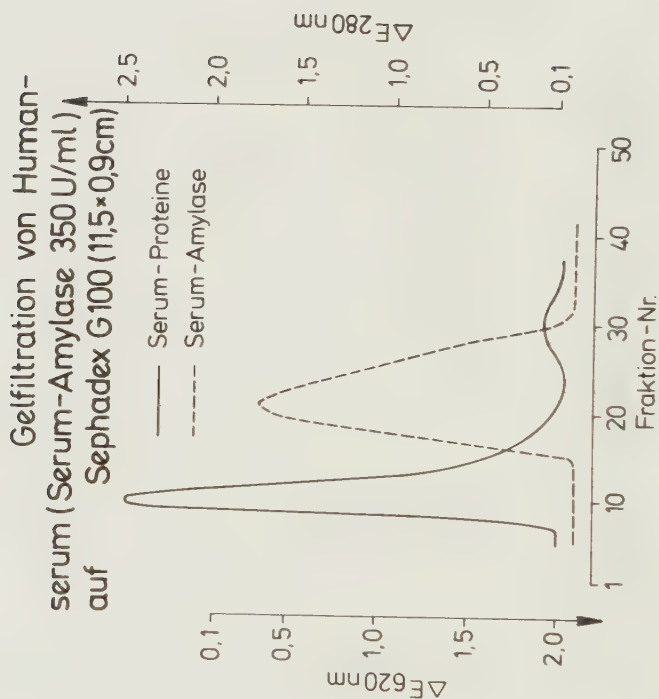


Abb. 2:

Elutionsprofil der Serumproteine (großer Peak Globuline, kleiner Peak Albumine) und der Serum-
amylase eines Patienten ohne Makroamylase.

Gelfiltration mit Sephadex G100 (11,5 × 0,9 cm)

- Sch., A. 17.4. S- Amylase
- - - Sch., A. 17.7. S- Amylase
- · - Sch., A. 17.4. S- Proteine

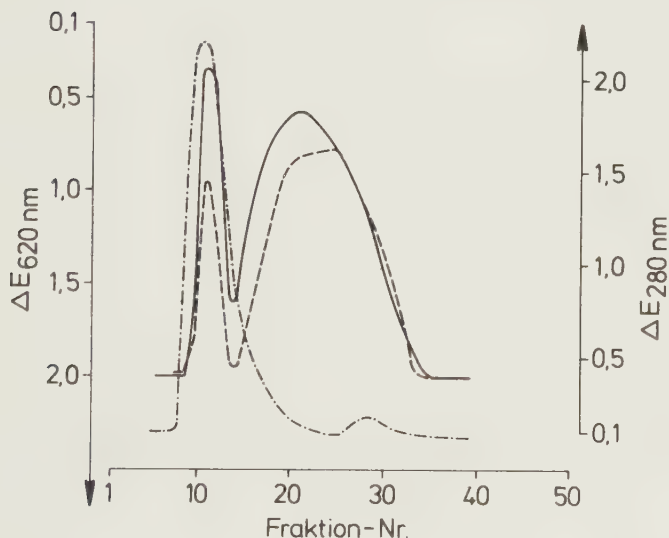


Abb. 3 :

Zwei Elutionsprofile der Serumamylasen eines Patienten mit einer Makroamylase (gemessen im Eppendorffphotometer bei ΔE 620 nm). Zusätzlich das Elutionsprofil der Serumproteine des Patienten (gemessen bei ΔE 280 nm).

Gelfiltration mit Sephadex G100 (11,5×0,9cm)

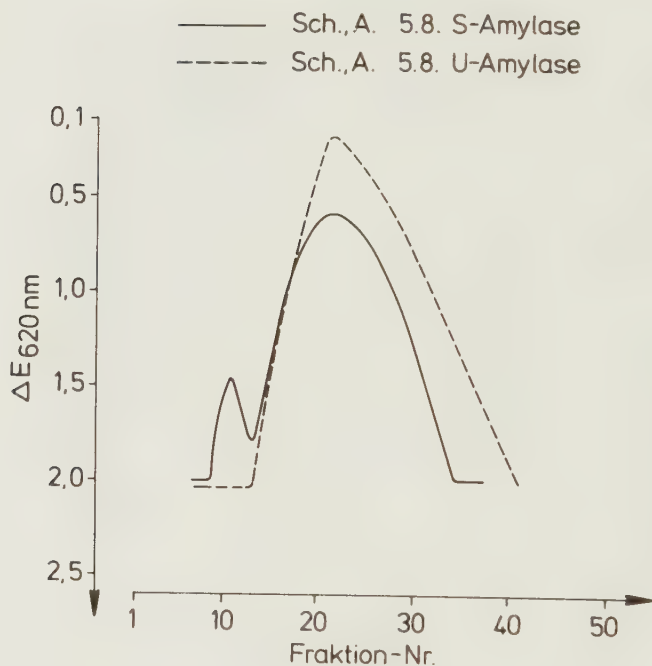


Abb. 4:

Elutionsprofil der Serumamylase eines Patienten mit einer Makroamylasämie. Bei dem zweiten Elutionsprofil handelt es sich um die Urinamylase des gleichen Patienten.

Gelfiltration mit Sephadex G 100 (11,5 × 0,9 cm)

- Sch., B. 6.6. S-Amylase
- - - Sch., B. 4.7. S-Amylase
- · - Sch., B. 4.7. S-Proteine

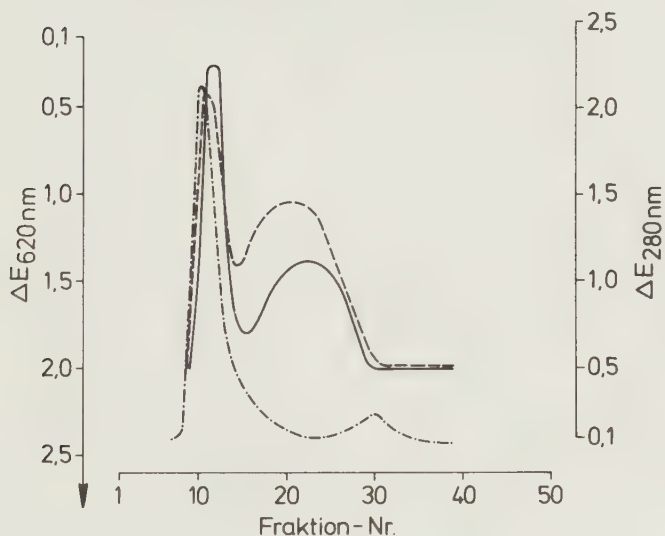


Abb. 5 :

Zwei Elutionsprofile der Serumamylasen eines Patienten mit einer Makroamylase (gemessen im Eppendorffphotometer bei ΔE_{620nm}). Zusätzlich das Elutionsprofil der Serumproteine des Patienten (gemessen bei ΔE_{280nm}).

Gelfiltration mit Sephadex G 100 (11,5 × 0,9 cm)

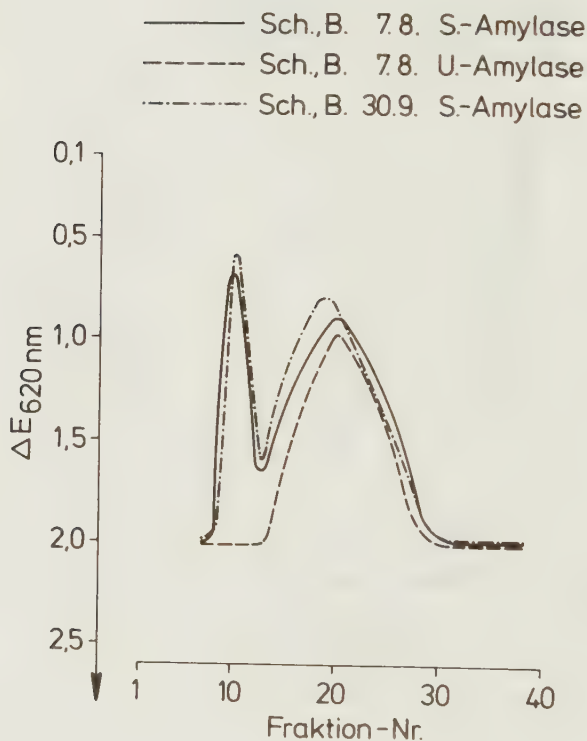


Abb. 6 :

Zwei Elutionsprofile der Serumamylasen eines Patienten mit einer Makroamylasämie. Bei dem dritten Elutionsprofil handelt es sich um die Urinamylase des gleichen Patienten.

Gelfiltration mit Sephadex G 100 (11,5 × 0,9 cm)

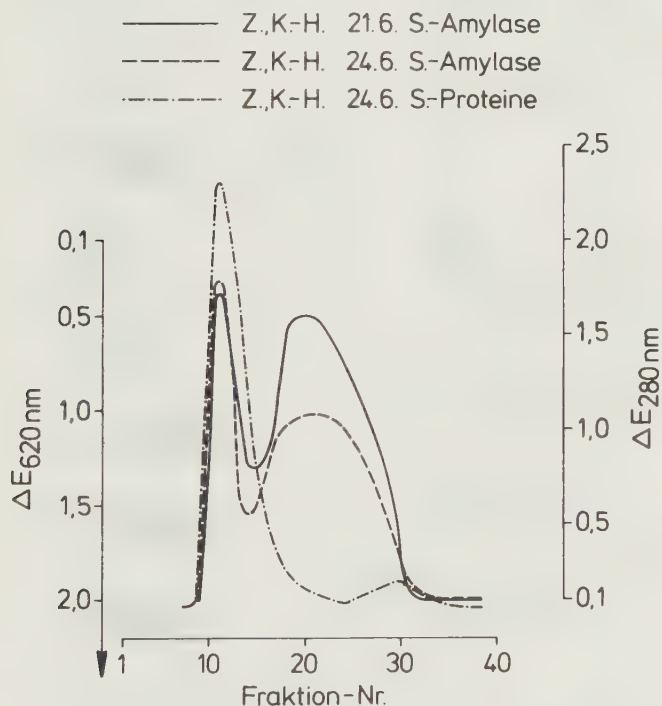


Abb. 7 :

Zwei Elutionsprofile der Serumamylasen eines Patienten mit einer Makroamylase (gemessen im Eppendorffphotometer bei ΔE 620 nm). Zusätzlich das Elutionsprofil der Serumproteine des Patienten (gemessen bei ΔE 280 nm).

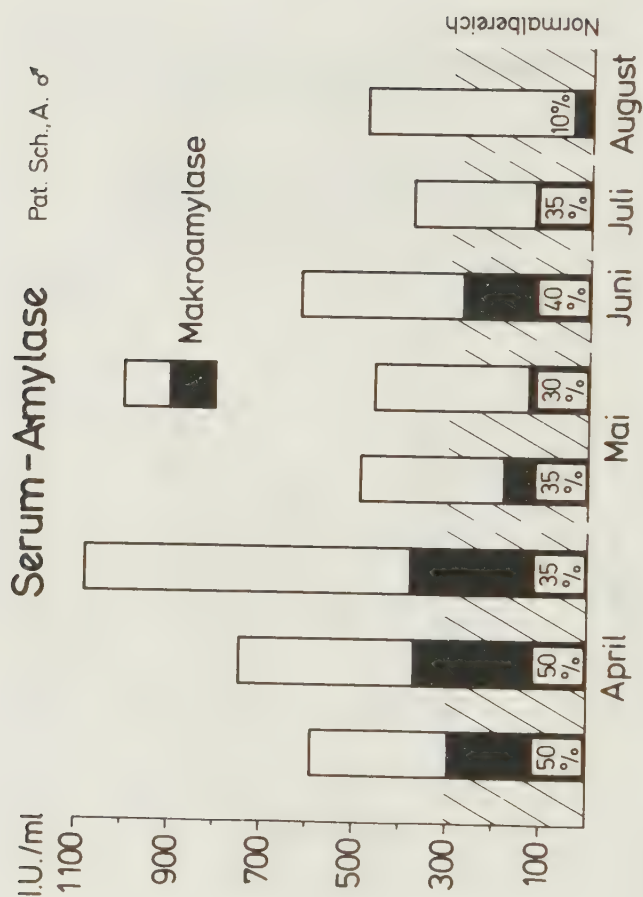


Abb. 8 :

Anteil der Makroamylase an der gesamten Serum-
amylase über einen Zeitraum von fünf Monaten.

Serum - Amylase

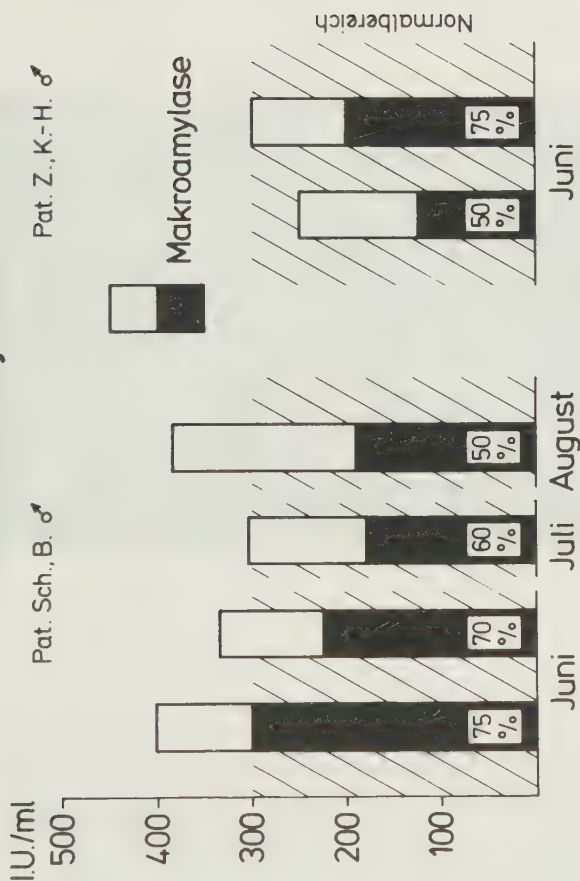


Abb. 9:

Anteil der Makroamylase an der gesamten Serumamylase von zwei Patienten über einen Zeitraum von drei bzw. einem Monat.

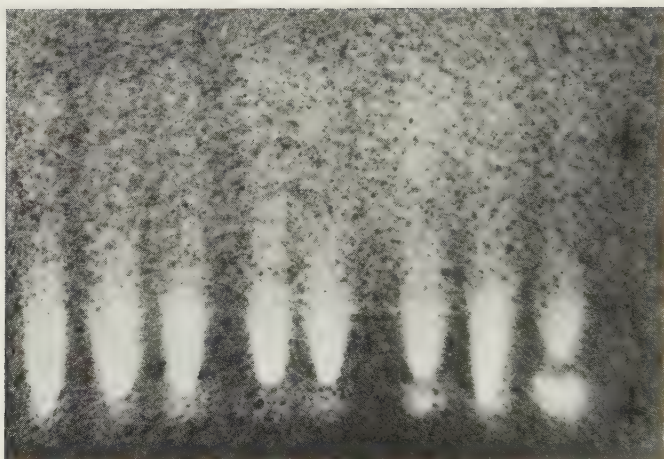


Abb. 10 :

Eine mit Sephadex G-200 Superfine beschichtete Dünnschichtchromatographieplatte nach einem Trennungslauf. Das untere Kreuz kennzeichnet die Markiersubstanz L-DNP-Alanin (Bereich, in dem die normale Amylase läuft), das obere Kreuz Blue Dextran 2000 (Bereich, in dem eine Makroamylase läuft). Auf dieser Platte liefen zwei Seren mit einer Makroamylase und ein normales Patientenserum. Die hellen Punkte, die eine Amylase darstellen, bewegen sich nur im L-DNP-Alanin-Bereich.

Gradientenzentrifugation

(116 400g 16 Stunden bei 4°C)

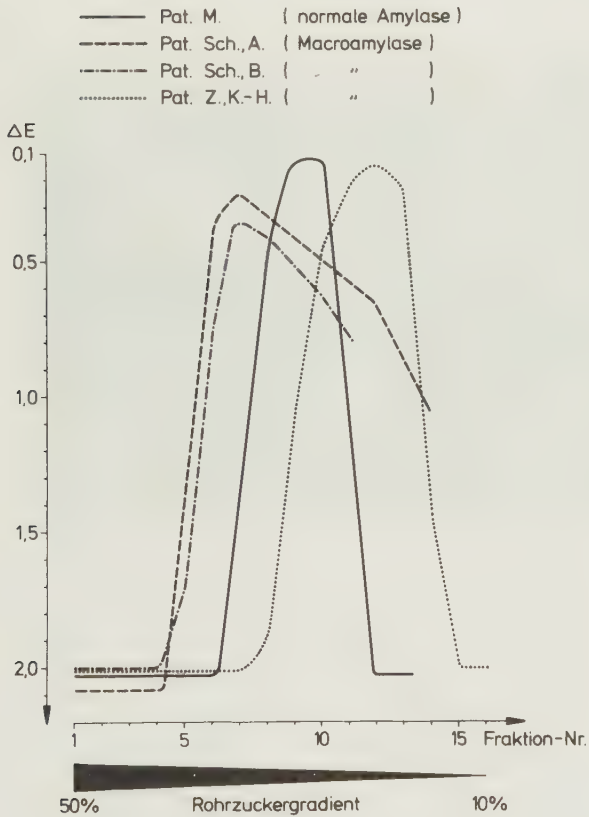


Abb. 11 :

Profil der Trennung der drei Makroamylaseseren und eines normalen Patientenserums mittels eines Rohrzuckerdichtegradienten in der Ultrazentrifuge.

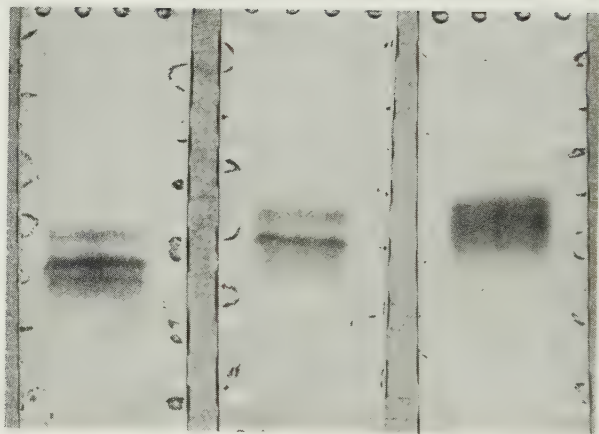


Abb. 12:

Trennung der Serumamylasen in ihre Isoenzyme auf Cellogelelektrophoresestreifen mit dem Puffersystem nach KOHN, J. (37) mit konstantem Strom von 0,7 mA/cm. Laufzeit 90 Minuten bei 4⁰ C Raumtemperatur.

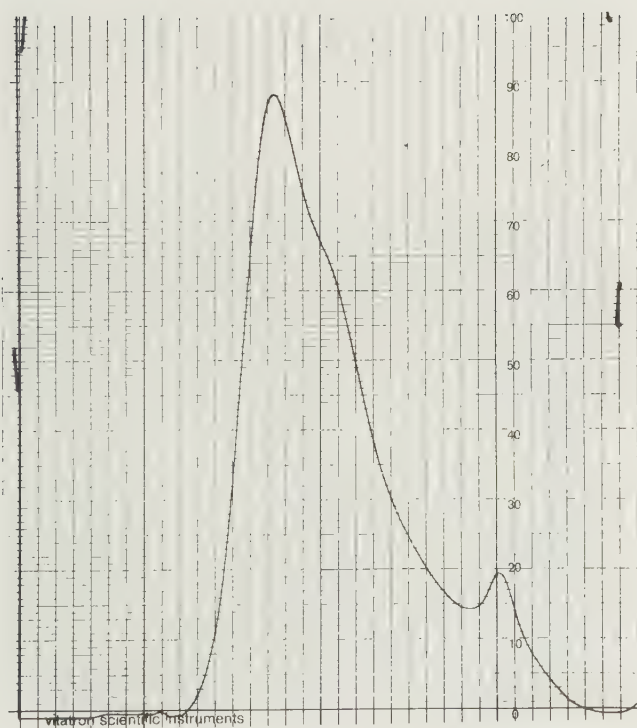


Abb. 13 :

Elektrophoretische Trennung eines normalen
Patientenserums (densitometrische Messung).

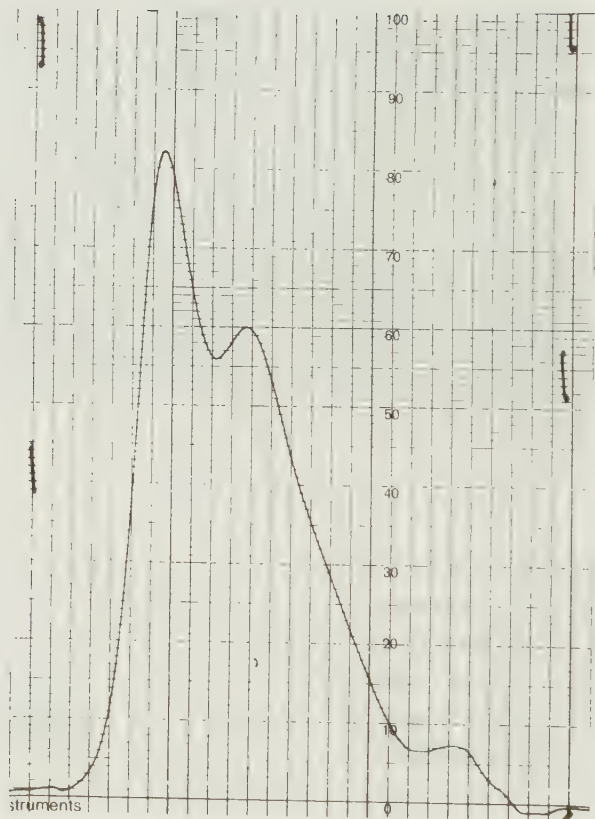


Abb. 14 :

Elektrophoretische Trennung des Makroamylaseserums
des Patienten Z., K.-H. (densitometrische Messung)

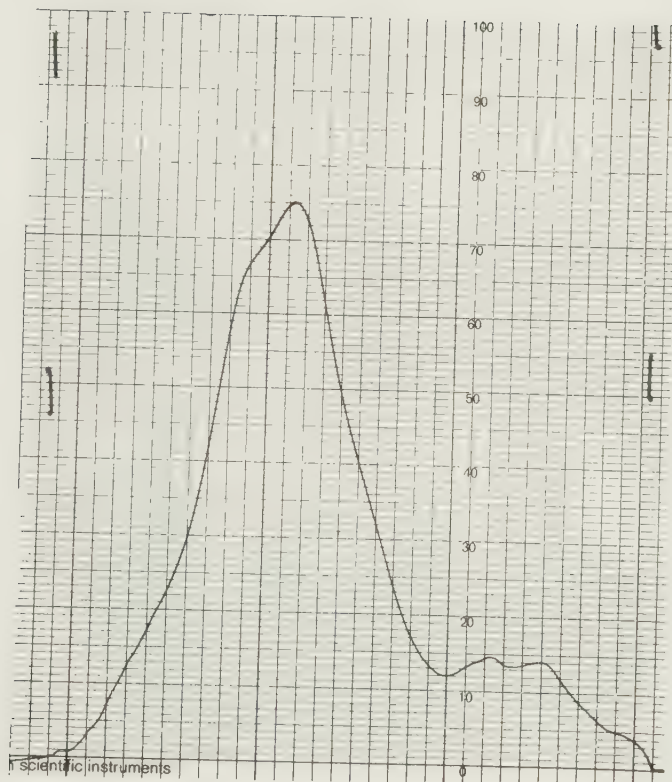


Abb. 15 :

Elektrophoretische Trennung des Makroamylaseserums
des Patienten Sch., B. (densitometrische Messung).

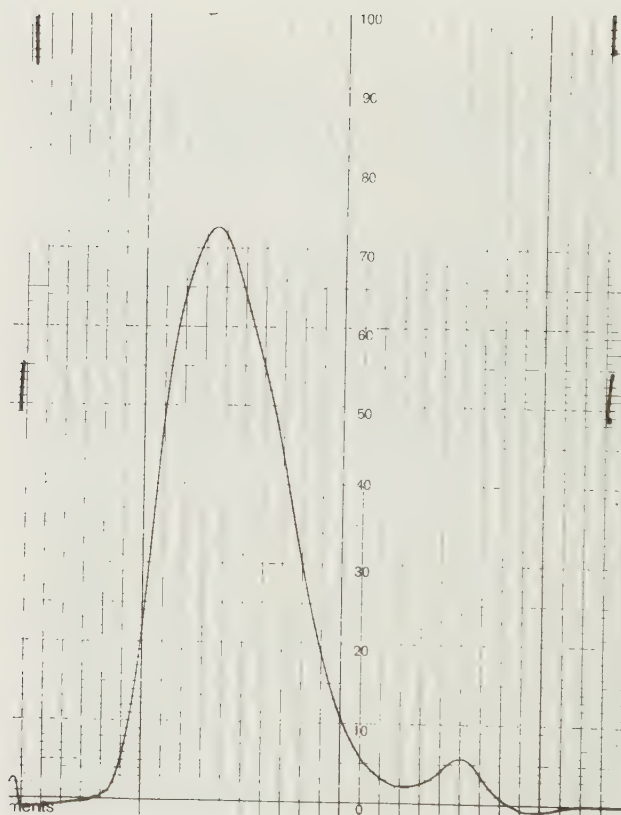


Abb. 16 :

Elektrophoretische Trennung des Makroamylase-
serums des Patienten Sch., A. (densitometrische
Messung).

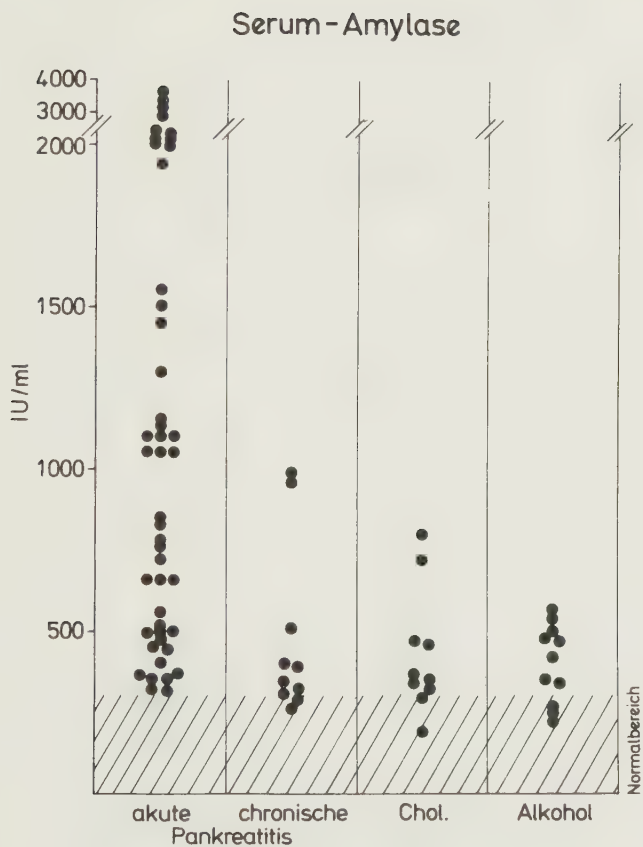


Abb. 17 :

Serumamylasewerte der einzelnen Patientengruppen.
(Chol.= Cholelithiasis und Choledocholithiasis).

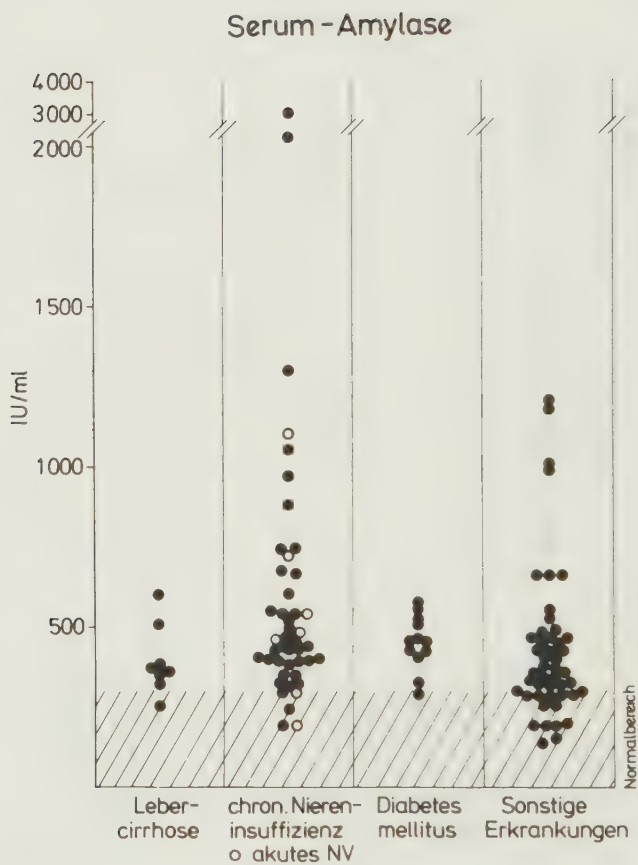


Abb. 18

Serumamylasewerte der einzelnen Patientengruppen.

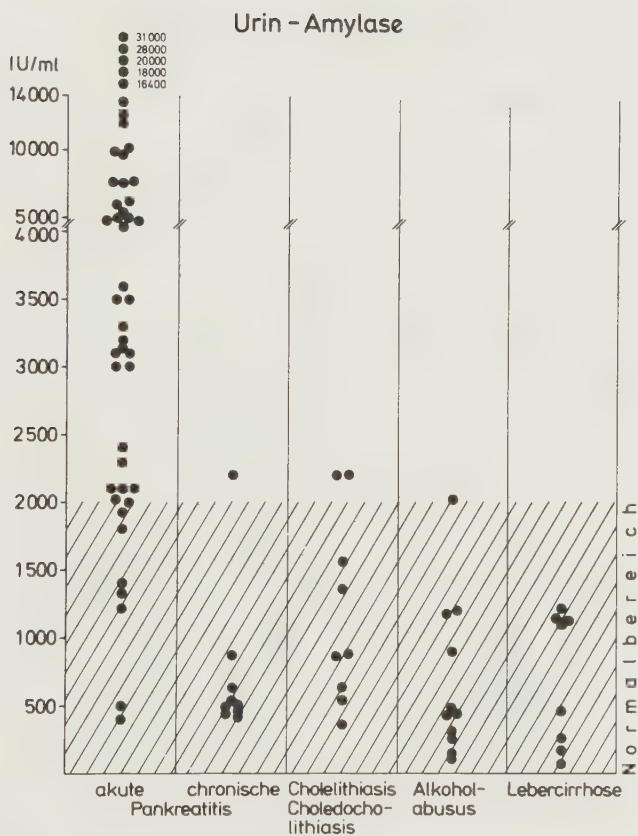


Abb. 19 :

Urinamylasewerte der einzelnen Patientengruppen.

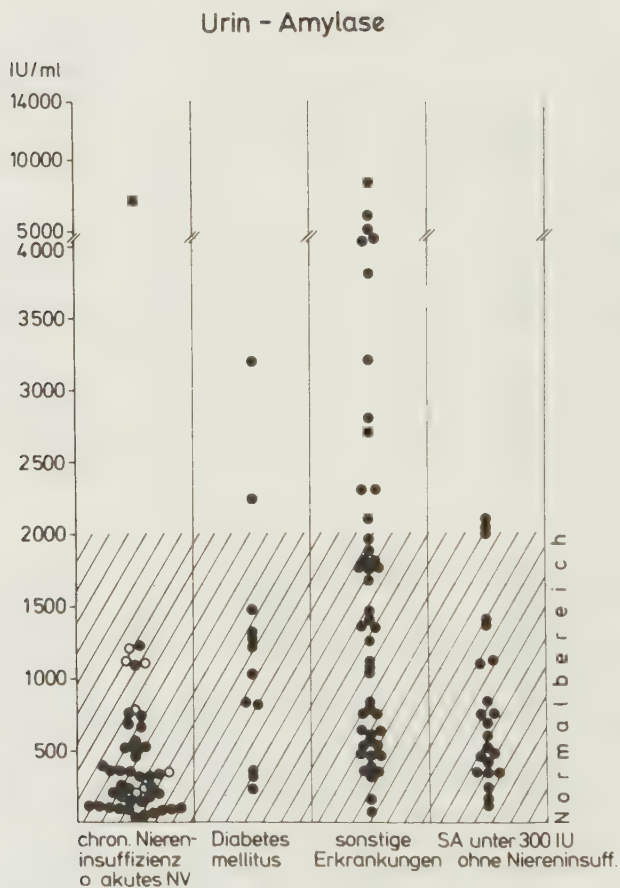


Abb. 20 :

Urinamylasewerte der einzelnen Patientengruppen.

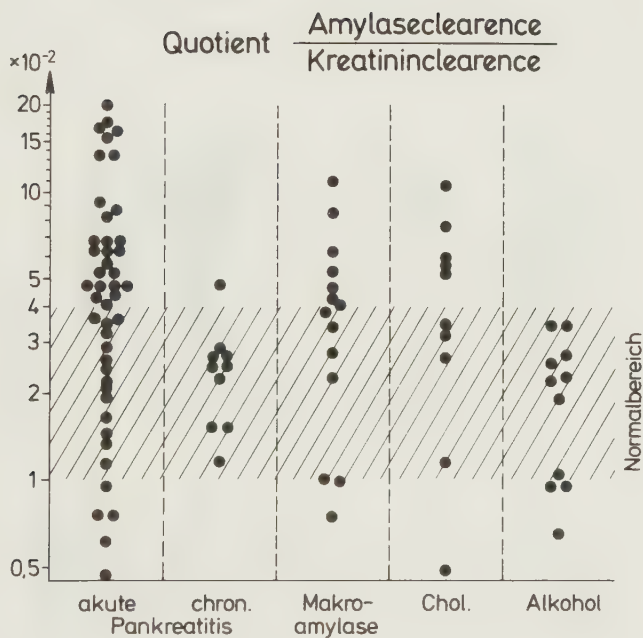


Abb. 21 :

Der Quotient Amylaseclearance / Kreatininclearance bei den Patientengruppen. (Logarithmischer Maßstab).
(Chol. = Cholelithiasis und Choledocholithiasis).

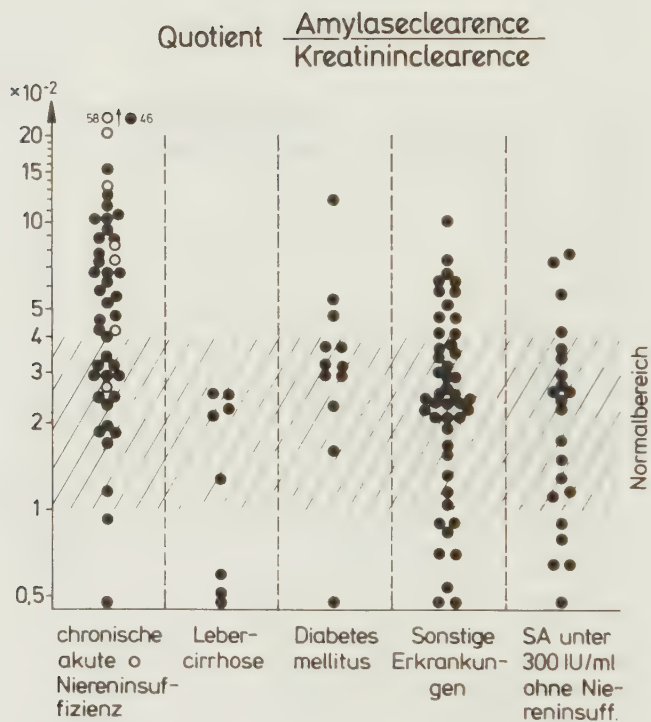


Abb. 22 :

Der Quotient Amylaseclearance / Kreatininclearance bei den Patientengruppen. (Logarithmischer Maßstab).

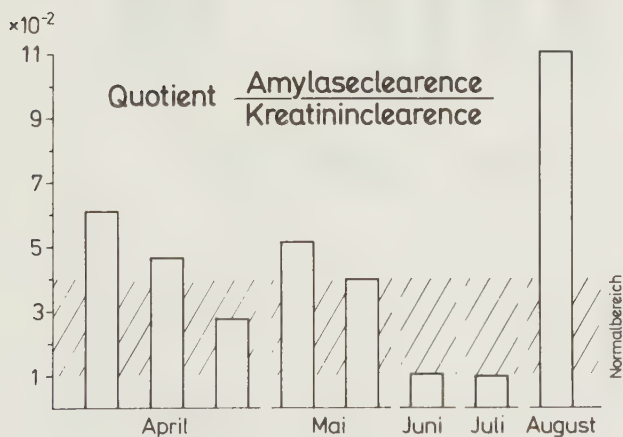
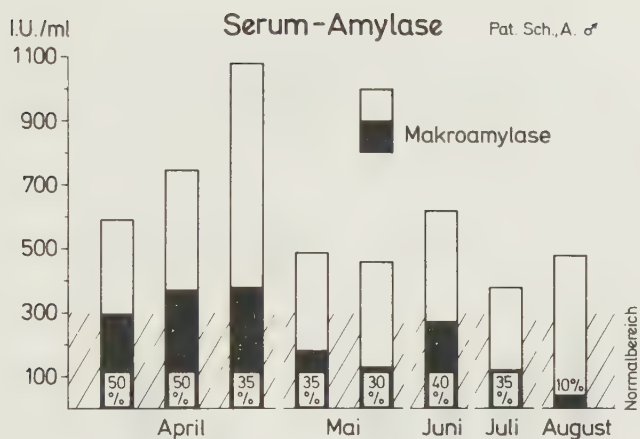


Abb. 23 :

Anteil der Makroamylase an der gesamten Serumamylase über einen Zeitraum von fünf Monaten. Darunter das zugehörige Diagramm mit dem entsprechenden Quotienten Amylaseclearance / Kreatininclearance.

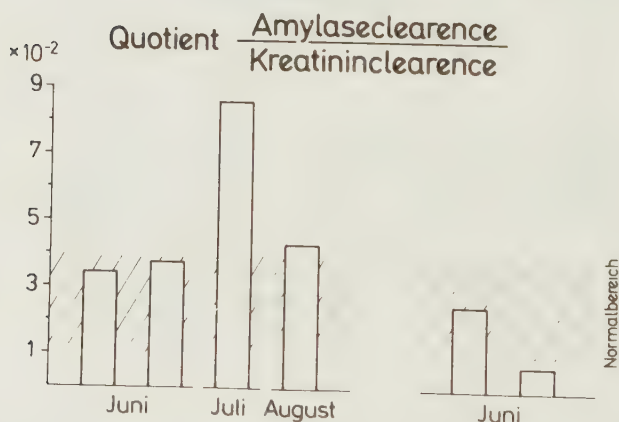
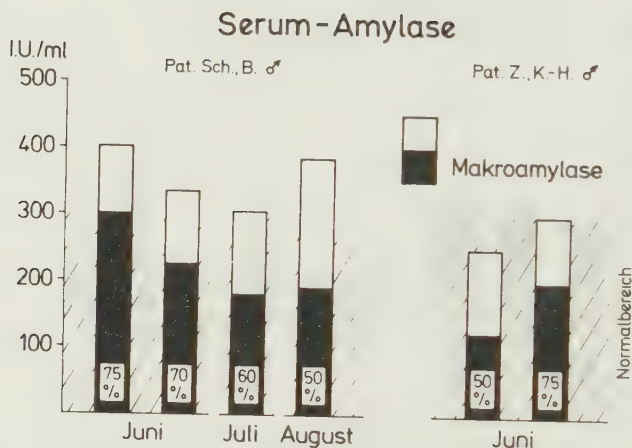


Abb. 24 :

Anteil der Makroamylase an der gesamten Serumamylase über einen Zeitraum von drei bzw. einem Monat. Darunter das zugehörige Diagramm mit dem entsprechenden Quotienten Amylaseclearance / Kreatininclearance.

C_{Am}/C_{Kr} in Abhängigkeit vom Serum-Kreatinin bei Patienten mit Niereninsuffizienz
Korrelation: 0,426

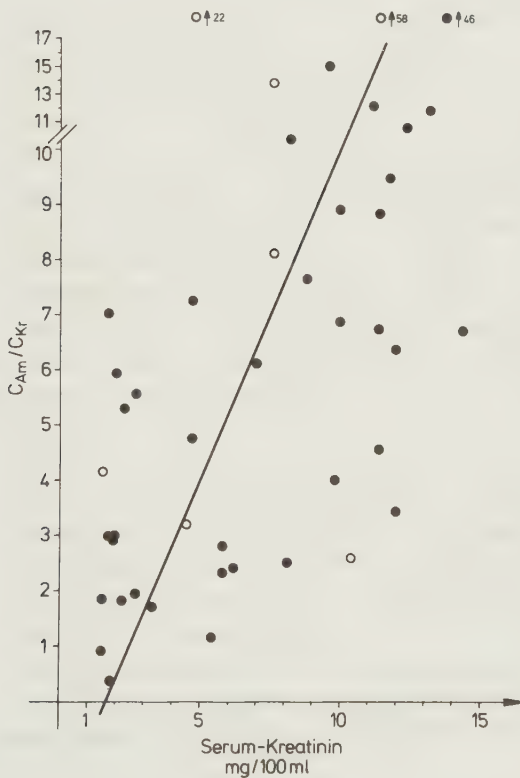


Abb. 25 :

Der Quotient Amylaseclearance zu Kreatininclearance in Abhängigkeit von Serumkreatinin. Der Tangens alpha der eingezeichneten Geraden beträgt 5,11.

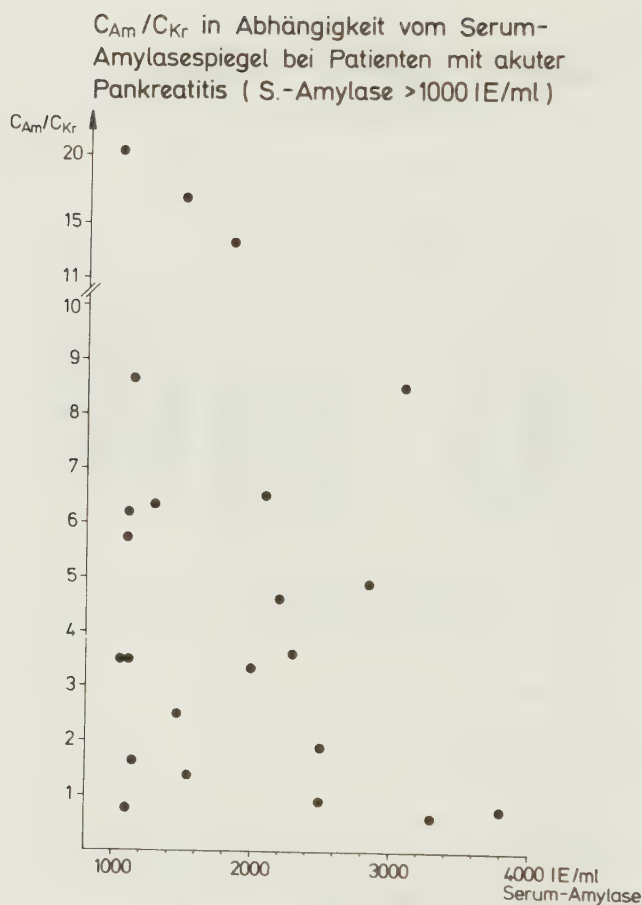


Abb. 26 :

Der Quotient Amylaseclearance zu Kreatininclearance
in Abhängigkeit von der Serumamylase bei Patienten
mit akuter Pankreatitis mit Serumamylasewerten
über 1000 IE/ml.

IV. D i s k u s s i o n

=====

1. Methoden zum Nachweis einer Makroamylasämie

Die Standardmethode zur Erfassung einer Makroamylasämie ist seit der Arbeit von WILDING, P. et al. 1964 (69) die Säulenchromatographie auf Sephadex. In der Folgezeit wurde die Methode durch FRIDHANDLER, L. durch Einführung von "Mikrosäulen" (19) wesentlich vereinfacht. Diese Methode benutzten auch wir in der vorliegenden Arbeit. Durch ihren geringeren Zeitaufwand wurde es uns ermöglicht, auch größere Patientenkollektive auf Makroamylase zu untersuchen.

Die Trennungsscharakteristik unserer Säulen ist gut, wie sich aus den Elutionsdiagrammen für Blue Dextran 2000, Cytochrom c und den Serumproteinen ergibt (Abb. 1,2). Wurden Urine unserer Patienten mit Makroamylase auf den Säulen chromatographiert, so fanden wir erwartungsgemäß nur einen Gipfel für die Amylaseaktivität. Dies ist ein weiterer Beweis für die Zuverlässigkeit unserer Trennungsmethode.

Von einigen Autoren (39) wird eine Wechselwirkung zwischen Amylase und dem Polydextrangel Sephadex vermutet, da seine Molekularstruktur der der Stärke ähnelt. Durch eine solche Interaktion könnte die Elution der Amylase auf unkontrollierte Weise ver-

zögert werden und eine zuverlässige Auftrennung von Amylasemolekülen unterschiedlicher Größe wäre mit Sephadex nicht möglich. Es hat sich jedoch gezeigt, daß sich normale und Makroamylase auf Sephadexsäulen genau in der Weise verhalten, wie es aufgrund ihrer, durch Ultrazentrifugation bestimmten, Molekulargewichte zu erwarten ist (8). Somit sind die Zweifel an der Brauchbarkeit von Sephadex für die vorliegenden Trennprobleme unberechtigt.

In der Literatur wird auch von Versuchen mit unterschiedlichem Erfolg berichtet, die Makroamylase mit der Elektrophorese oder der Ultrazentrifugation nachzuweisen.

HEDGER, R.W. und HARDISON, W.G.M. (26) berichten von einer gelungenen elektrophoretischen Auftrennung eines Makroamylaseserums in die normale Serum- und Makroamylase auf Cellogelstreifen. Zum Nachweis der Amylasen benutzten sie einen mit Kartoffelstärke versehenen Barbituratpuffer und eine Jodlösung. Mit dieser Methode konnten wir überhaupt keine Amylase nachweisen (siehe Kapitel Elektrophorese). Aus den Versuchen von HEDGER, R.W. und HARDISON, W.G.M. (26) geht hervor, daß die normale Amylase im Bereich der alpha 1- und die Makroamylase im Bereich der gamma-Globuline wandern. An ihren Versuchen erscheint uns allerdings zweifelhaft, daß trotz guter Trennung in die beiden Amylaseformen keine Banden der Isoamylasen zu sehen sind. Diese wurde aber von anderen Untersuchern und auch von uns immer nachgewiesen (25).

Von einem weiteren Versuch mit Hilfe der Papier-
elektrophorese berichten DAVIS, J. et al. (12).
Ihnen ist es zwar gelungen, zu zeigen, daß
normale Amylase und Makroamylase sich zwischen
den Banden der beta- und gamma-Globuline bewegen,
doch konnten sie keine Trennung der beiden Amylase-
formen erzielen.

Mit der Elektrophorese ist es uns bisher auch
nicht gelungen, die Makroamylase von der normalen
Amylase abzutrennen. Möglicherweise kam es hier
durch Wärmeentwicklung und/oder durch Einwirken
des elektrischen Feldes zu einer Zerstörung
des Makroamylasekomplexes.

Die Ultrazentrifugation wurde erfolgreich von
SPIEGEL, M. (59) und UEDA, M. et al. (66) einge-
setzt. Sie ermittelten für die Makroamylase eine
Sedimentationskonstante von 7,7 S bzw. 10,7 S
und für die normale Amylase eine Sedimentations-
konstante von 4,5 S bis 5 S.

Mit der Ultrazentrifugation machten wir nur einige
orientierende Versuche. Hierbei war die von uns
benutzte g-Zahl (116 400 g) deutlich niedriger als
die von UEDA, M. benutzte. Außerdem war die Repro-
duzierbarkeit der Dichtegradienten nur ungenügend.
Dies dürfte zu unseren unbefriedigenden Ergebnissen
beigetragen haben.

Über den Nachweis von Makroamylase mit Hilfe der
Gelchromatographie auf Dünnschichtplatten wurde
bisher nur von LONG, W.B. et al. (44) und PETERS, T.L.
et al. (49) berichtet. Die Gruppe um LONG, W.B.

benutzte zum Nachweis der Amylase ein Abklatschverfahren mit einem in einer Stärkelösung getränkten Filterpapier, das anschließend ebenfalls mit einer Jodlösung entwickelt wurde. Dieses Verfahren führten wir jedoch nicht durch, sondern verwendeten das vereinfachte von PETERS, T.L. et al. Diese benutzten Seren mit höherer Aktivität der Makroamylase, als sie uns zur Verfügung standen. Wir vermuten, daß die Empfindlichkeit der Entwicklungsreaktion nicht ausreichte, um unsere niedrigen Makroamylaseaktivitäten sicher nachzuweisen.

2. Die physikalisch-chemische Natur der Makroamylase

Die Amylaseaktivität im Blut wird bestimmt durch die Produktion des Enzyms in verschiedenen Geweben, den Übertritt durch die Lymphe ins Blut, den Abbau im retikuloendothelialen System und Ausscheidung durch glomeruläre Filtration in der Niere. Letztere stellt für die Abnahme der Aktivität im Serum den entscheidenden Anteil dar (59, 60). Die Filtration der Amylase ist nur möglich aufgrund des niedrigen Molekulargewichts von ca. 45 000 und einer Größe von 29 Å. Die Amylaseclearance beträgt beim Gesunden 1 bis 3 ml/Minute (59).

Bedingungen, unter denen die Amylaseaktivität im Serum erhöht sein kann, sind : Pankreas- und andere abdominelle Erkrankungen, Speicheldrüsenerkrankungen, Niereninsuffizienz, nach Opiat-medikation, paraneoplastisch beim Bronchialcarcinom, bei allgemeinen Virusinfektionen und postoperativ bei Abdominaleingriffen (27, 32, 47).

Ein weiterer, jedoch recht seltener Grund, ist das Auftreten einer Makroamylase (10, 31, 42, 61), ein Molekül mit Amylaseaktivität, dessen Molekulargewicht durch Ultrazentrifugation im Rohrzuckergradienten mit ca. 150 000 (39), in einigen Fällen sogar bis zu 1 Million (41) bestimmt wurde. Ein Molekül, das nach Angaben von LEVITT, M.D. et al. (39) mit einem solch hohen Molekulargewicht im Bereich der 7 S bis 19 S Globuline sedimentiert, kann in den Nierenglomerula nicht mehr filtriert werden.

Über die Zusammensetzung der Makroamylase gibt es im Wesentlichen vier Theorien :

1. Komplexbildung der Amylase mit Globulinen (8, 24, 39).
2. Komplexbildung der Amylase mit einem Kohlenhydrat eines Glykoproteins oder direkt an ein zirkulierendes Polysaccharid (59, 63).
3. Polymerisation normaler Amylasemoleküle (24).
4. Bildung eines makromolekularen Isoenzym (59).

Nach den bisher vorliegenden Befunden kommt die größte Wahrscheinlichkeit der Theorie 1 zu :

1. Bei pH 3 konnte eine Dissoziation des Komplexes in einen Amylase- und Globulinanteil erzielt werden. Durch Inkubation bei pH 7,2 bildete er sich wieder neu (39, 41, 59, 65).
2. Es gelang durch Zusatz von gamma-Globulinen, die von einem Makroamylasämiepatienten gewonnen wurden,

zu isolierter Serumamylase einen Komplex aus gamma-Globulinen und Serumamylase mit den Eigenschaften einer Makroamylase zu erzeugen. Hierbei handelt es sich nach LEVITT, M.D. et al. (39) nicht um eine unspezifische Proteinbildung, sondern um eine Antigen-Antikörperreaktion. Die Möglichkeit einer Autoimmunreaktion wird hier von den Autoren in Erwägung gezogen (39).

3. Durch Zusatz von Anti-IgA und/oder Anti-IgG gelang es, den Makroamylasekomplex zu präzipitieren (25, 39, 59, 70). Allerdings gelang dies nicht in allen Fällen (24, 41, 59).
4. Elektrophoretisch konnte außerdem eine Wanderung des Makroamylasekomplexes im Bereich der gamma-Globuline nachgewiesen werden (12).

Zahlreiche Befunde unterstützen also die Theorie, daß es sich bei der Makroamylase um einen Komplex aus Immunglobulinen bzw. anderen Proteinen und Amylase handelt. Aus der Literatur geht aber auch hervor, daß der Komplex, der das Phänomen "Makroamylase" hervorruft, sehr unterschiedlich sein kann: Die Elektrophoresemuster und die Sedimentationskonstanten der Makroamylase wechseln und die Immunpräzipitation gelingt nicht immer mit den gleichen Antikörpern. In einigen Fällen wurde Anti-IgA, in anderen Anti-IgG benötigt.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß das Phänomen "Makroamylasämie" möglicherweise durch andere verschieden aufgebaute Moleküle oder Molekülkomplexe hervorgerufen werden kann, zeigt eine Arbeit von BERK, J.E. et al. (6). Hier wird von einer Hyper-

amylasämie bei einem Patienten berichtet, bei dem der Verdacht einer Makroamylasämie vorlag. Die laborchemische Untersuchung ergab aber eine besondere Speichelamylase ungeklärter Genese. Diese identifizierte Isoamylase ("S-type") konnte aufgrund ihres leicht erhöhten Molekulargewichtes nicht renal filtriert werden und täuschte so eine Makroamylase vor. BERGGREN, T. et al. (4) wiesen ebenfalls bei einem Patienten eine Makroamylase nach, deren Molekulargewicht nur wenig über dem der normalen Amylase lag.

3. Klinische Bedeutung einer Makroamylasämie

Genausowenig wie es bisher möglich war, die Makroamylase chemisch-physikalisch einheitlich zu charakterisieren, ist es gelungen, diesem Symptom ein bestimmtes Krankheitsbild zuzuordnen.

Von den in der Literatur beschriebenen Fällen konnte nur eine Gruppe von vier Patienten mit einem Malabsorptionssyndrom in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei handelt es sich um einen IgA-Amylasekomplex, dessen Sedimentationskonstante bei 11 S lag (9, 24, 59, 70). Bei den anderen Patienten reichen die Angaben von einer reinen Makroamylasämie ohne Krankheitssymptome bis zu den verschiedensten Diagnosen (Mumps mit diabetischer Ketoacidose, akute intermittierende Porphyrrie, Alkoholismus, Ulcus duodeni, Herzinfarkt, u.a.) (10, 31, 42, 61, 64).

Obwohl bisher kein exakter Zusammenhang zwischen Makroamylase und einem Krankheitsbild festgestellt werden konnte, geht aus den Untersuchungen von

BARROWS, D. (3) hervor, daß die Häufigkeit einer Makroamylasämie bei Probanden ohne jegliche Krankheits-symptome signifikant geringer ist, als bei kranken Patienten.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist der Befund einer Makroamylasämie nur dann klinisch relevant, wenn ein ansonsten symptomfreier Patient konstant eine erhöhte Aktivität der Serumamylase aufweist. Sobald in solchen Fällen eine Makroamylase nachgewiesen ist, erübrigt sich eine weitere aufwendige und belastende Diagnostik zur Abklärung der Hyperamylasämie.

Wie die Untersuchung von BERK, J.E. et al. (6) gezeigt hat, und auch mit Hinblick auf die diagnostische Wertigkeit des Quotienten Amylaseclearance zu Kreatininclearance, sollte man zur Zeit nur dann von einer Makroamylase sprechen, wenn man sie zumindest mit der Gelfiltration nachgewiesen hat. Nur so lassen sich bis jetzt diesbezügliche Fehldiagnosen vermeiden.

4. Besprechung der eigenen Fälle von Makroamylasämie

Bei unseren drei Patienten mit Makroamylase lagen drei verschiedene Erkrankungen vor. Dies steht in guter Übereinstimmung zur Literatur, in der eine Makroamylasämie bei den verschiedensten Diagnosegruppen beschrieben wurde.

Bei dem Patienten Sch., A. wurde postmortal ein kleinzelliges Bronchialcarcinom nachgewiesen. Die Spekulation liegt nahe, die Makroamylasämie hier als

Ausdruck eines sog. paraneoplastischen Syndroms aufzufassen. Dies stünde in Analogie zu dem Bericht von AMMAN, R.W.(1) über einen Patienten mit Hyperamylasämie bei Bronchialcarzinom. Bei diesem Fall lag jedoch keine Makroamylasämie vor.

Besondere Beachtung bei unserem Patienten verdient die Tatsache, daß der Anteil der Makroamylase an der Gesamtaktivität der Serumamylase nach dem Einsetzen einer Zytostatikatherapie konstant abnahm (Abb. 8). Dies spricht für die Theorie eines Immunglobulin-Amylasekomplexes.

Bei den anderen beiden Patienten ist ein Zusammenhang zwischen der jeweiligen Grunderkrankung (Lebercirrhose bei chronischem Alkoholismus, Niereninsuffizienz bei chronischer GN) und dem Auftreten einer Makroamylase nicht zu sehen.

5. Höhe der Serumamylasespiegel bei Makroamylasämie

Die Mehrheit der bisher beschriebenen Patienten mit Makroamylasämie wiesen erhöhte Gesamtaktivitäten der Serumamylasen auf. Dies paßt gut zu dem Konzept, daß die Makroamylase sich wegen ihrer verminderten Nierengängigkeit im Serum anreichert.

Alle Patienten, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden, wiesen bei Aufnahme in die Klinik erhöhte Serumamylasewerte auf. Bei Verlaufskontrollen konnte jedoch bei allen drei Patienten mit Makroamylase auch nach Abfall der Serumamylaseaktivität

in den Normalbereich noch Makroamylase nachgewiesen werden (Abb. 8,9). Bereits BARROWS, D. (3) berichtet, daß eine Makroamylase keineswegs immer mit einer Hyperamylasämie verbunden ist. Die Deutung dieser Befunde bereitet allerdings einige Schwierigkeiten.

Bei unserem Patienten Sch., B., der seit längerer Zeit wegen einer chronischen Niereninsuffizienz in einer Dialysebehandlung ist, muß man an die Möglichkeit denken, daß das Amylasemolekül dialysabel ist. Dies würde auch die relativ niedrigen Serumamylasewerte bei einem hohen Makroamylaseanteil von bis zu 75 % (Abb. 9) erklären.

Eine allgemeine Erklärung für die Tatsache, daß eine Makroamylase sowohl mit erhöhten als auch mit normalen Serumamylasewerten vorkommt, würde die Erscheinung bieten, daß neben der Makroamylase in Form eines stabilen Antigen-Antikörperkomplexes auch Makromoleküle aufgrund von unspezifischen Protein-Antikörperreaktionen vorliegen. Diese Möglichkeit wird auch von LEVITT, M.D. et al. (39) diskutiert. Bisher unbekannte Mechanismen, über die man nur spekulieren kann, könnten die labileren unspezifischen Proteinbindungen spalten. Dies würde dann zu einer höheren Amylaseclearance und damit auch zu normalen Serumamylasewerten führen.

Eine andere Möglichkeit, die sich allerdings auch im Rahmen der Spekulation bewegt, wäre ein höherer Abbau der Amylase und hier speziell der Makroamylase durch das "RES". Dies dürfte dann aber nur bei den Patienten der Fall sein, die eine Makroamylase bei normalen Serumamylasewerten aufweisen.

6. Die Häufigkeit einer Makroamylasämie

Über die Häufigkeit einer Makroamylasämie liegen bisher eine Arbeit von BARROWS, D. (3) aus den USA und IMRIE, C.W. et al. (30) aus Schottland vor. Beide führten ihre Untersuchungen an einem relativ großen und gemischten Kollektiv durch, allerdings mit unterschiedlichen Methoden. BARROWS, D. arbeitete mit der Gelfiltration auf Mikrosäulen. IMRIE, C.W. dagegen bestimmte die Makroamylase mit einer Methode, die auf einer temperaturabhängigen Aktivitätsdifferenz der normalen und der Makroamylase beruht (28).

BARROWS untersuchte 891 Patienten. Sein Kollektiv setzte sich aus folgenden Gruppen zusammen :

1. Gruppe : 440 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen. Hierunter befanden sich 9 Patienten mit einer Makroamylasämie (= 2,0 %).
2. Gruppe : 251 Probanden ohne Erkrankungen. Hier wurde nur ein Makroamylasämiefall gefunden (= 0,4 %).
3. Gruppe : 200 Neugeborene, bei denen keine Makroamylase gefunden wurde.

Es wurden also 10 Makroamylasämiefälle bei 891 Patienten nachgewiesen, was in diesem gemischten Gesamtkollektiv einer Häufigkeit von 1,1 % entspricht.

IMRIE, C.W. führte seine Untersuchung an 2109 Einwohnern einer schottischen Gemeinde durch, von denen

nur 39 (= 2 %) leicht erhöhte Serumamylasen aufwiesen. In keiner der Serumproben konnte er mit seiner Methode eine Makroamylase nachweisen. Bei früheren Untersuchungen an 100 Patienten eines Krankenhauses konnte er einen Makroamylasefall mit der Methode nachweisen (= 0,1 %) (31).

Unser Kollektiv setzte sich aus 190 Patienten mit unterschiedlichen Diagnosen unserer Klinik zusammen (Tabelle I). Die Höhe der Serumamylasewerte schwankte zwischen normal und stark erhöht (Abb. 17, 18). Die Häufigkeit einer Makroamylasämie lag bei uns bei 1,6 %.

7. Der Quotient aus Amylaseclearance und Kreatininclearance

a) Theoretische Überlegungen und Angaben aus der Literatur

Durch glomeruläre Filtration gelang ein Teil der Amylase aus dem Plasma in den Urin. Die Amylasekonzentration im Urin hängt einerseits von der glomerulären Filtration, andererseits von der Stärke der Diurese ab. Daraus resultiert ein weiter Normalbereich der Urinamylasewerte von 100 - 2000 mU/ml (16).

Eine einfache Überlegung läßt zunächst vermuten, daß beim Vorliegen einer Makroamylasämie infolge verminderter Nierengängigkeit der Amylase die Amylaseclearance niedriger ist als gewöhnlich. Demnach müßte auch der Quotient aus Amylaseclearance und Kreatininclearance absinken, sofern

die Kreatininclearance durch den Faktor Makroamylase nicht beeinflusst wird. Nach LEVITT, M.D. (43) beträgt die Amylaseclearance normalerweise 1 bis 4 % der Kreatininclearance. Der Normalbereich liegt also zwischen 0,01 und 0,04.

Durch Bezug der Amylaseclearance auf die Kreatininclearance werden Unterschiede der Diurese und der glomerulären Filtration berücksichtigt. So liegt zum Beispiel die Amylaseclearance bei einem Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter dem Wert eines Normalkollektivs. Der Quotient aus Amylaseclearance und Kreatininclearance liegt aber für den gleichen Patienten durchaus im Bereich der Norm (43). Somit kann der Quotient als Maß der renalen Amylaseausscheidung dienen, da er unabhängig von dem Einfluß der allgemeinen Nierenfunktion ist.

In Übereinstimmung mit diesem theoretischen Konzept wird in der Literatur einheitlich berichtet, daß bei Makroamylasämie der Clearancequotient unter 0,01 liegen soll (43, 62). Erhöhte Werte wurden bei der Pankreatitis angegeben (40, 53, 67). Nach LEVITT, M.D. (43) lagen die Werte in den ersten vier Tagen ausnahmslos über 0,04, danach sanken sie bis auf 0,02 ab. Diese hohen Werte des Quotienten sollten demnach für eine Hyperamylasämie bei akuter Pankreatitis charakteristisch sein. Eine Ketoacidose bei Patienten mit Diabetes mellitus und das Krankheitsbild in den ersten Tagen nach einer Verbrennung wurden in der Literatur ebenfalls als Ursache für eine Erhöhung des Quotienten über 0,04 angegeben (38).

b) Eigene Ergebnisse

Die Literaturangaben finden durch unsere eigenen Untersuchungen keine Bestätigung. Weder bei Makroamylasämie noch bei akuter Pankreatitis ist der Clearance-Quotient in typischer Weise verändert :

1. Bei unseren drei Patienten mit Makroamylase errechneten wir den Quotienten über einen Zeitraum von zwei, drei bzw. fünf Monaten insgesamt 14 mal. Dabei ergab sich nur einmal bei einem Patienten ein Wert von 0,004 und bei einem weiteren zwei Werte von 0,009 und 0,01. Bei den restlichen Bestimmungen lag der Quotient zwischen 0,025 und 0,113 (Abb. 23, 24). Auch konnten wir keine Korrelation zwischen dem Makroamylaseanteil eines Serums und der Höhe des Clearance-Quotienten feststellen, wie sie von LEVITT, M.D. (43) vermutet wurde.

Soweit dies den Angaben der Literatur entnommen werden kann, wurden die Untersuchungen zum Clearance-Quotienten bei Makroamylase an Patienten durchgeführt, deren Serumamylaseaktivität stark erhöht war. Bei unseren Makroamylasepatienten dagegen lag die Aktivität der Serumamylasen im Normbereich oder nur gering darüber. Es ist zumindest denkbar, daß dies eine Ursache für unsere von der Literatur abweichenden Befunde bei der Bestimmung des Clearance-Quotienten sein könnte.

2. Die Berichte über eine charakteristische Erhöhung des Quotienten bei der akuten Pankreatitis können wir auch nicht bestätigen. Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, streuten die Werte bei unseren 45 Patienten zwischen 0,005 und 0,2. Die Bestimmung der Laborwerte erfolgte bei uns ebenfalls in den ersten vier Tagen nach der Diagnosestellung.

In den 10 Fällen mit chronischer Pankreatitis lag der Quotient größtenteils im Normbereich.

3. Die Werte unserer Patienten mit Niereninsuffizienz zeigen eine relativ große Streubreite zwischen 0,004 und 0,46. In 65 % der Fälle lagen sie aber über dem Normbereich von 0,04. Da die Absolutwerte der Serumamylase relativ niedrig lagen, kann es als ausgeschlossen gelten, daß diese hohe Aktivität durch eine zusätzlich bestehende Pankreatitis verursacht wurde.

Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, zeigte sich eine Tendenz zum Anstieg des Quotienten mit Zunahme der Niereninsuffizienz. Die mathematische Behandlung der Ergebnisse zeigte sogar eine signifikante Korrelation zwischen den Serumkreatininwerten und den Quotienten aus Amylaseclearance zu Kreatininclearance von 0,426. Offensichtlich wird also durch Nierenfunktions Einschränkung die Clearance der Amylase relativ weniger beeinträchtigt als die des Kreatinins.

In der Gruppe mit Cholelithiasis bzw. Chole-
docholithiasis, chronischem Alkoholabusus, Leber-

zirrhose, Diabetes mellitus und sonstigen Erkrankungen (zusammen 100 Patienten) fanden wir keine typischen Veränderungen des Quotienten.

Insgesamt fanden wir bei unseren 190 Patienten 28 mal einen Wert von weniger als 0,01 für den Quotienten. Wir hätten also bei der Anwendung dieses Kriteriums in 15 % der Fälle die Diagnose Makroamylase stellen müssen, obwohl ihr Vorhandensein durch die Untersuchung mit der Gel-filtration sicher ausgeschlossen worden ist.

Nach unseren Befunden ist somit eine Erhöhung des Quotienten auf Werte über 0,04 relativ typisch für eine Niereninsuffizienz, nicht dagegen für eine akute Pankreatitis. Eine Verminderung des Quotienten unter 0,01 hat nach unseren Ergebnissen keinerlei diagnostische Aussagekraft.

Diese Ergebnisse stehen im diametralen Gegensatz zu allen Arbeiten, die sich bisher mit der Treffsicherheit des Clearance-Quotienten beschäftigt haben (40, 43, 53, 62 67).

Als Erklärung für diese Abweichungen müßte man folgende Überlegungen diskutieren :

1. Möglicherweise werden mit dem Phadebas-Amylasetest der Firma Pharmacia nicht nur Amylase, sondern auch unspezifische Esterasen (29) nachgewiesen. In der Literatur wurden die Aktivitäten mit einer saccharogenen Methode bestimmt (43). Über

eigene Erfahrungen zur Spezifität verfügen wir nicht. Sollten tatsächlich Unterschiede in der Spezifität dieser Tests bestehen, müßte dies auch zu einer unterschiedlichen Aussagekraft des Quotienten führen.

2. Wie schon in einem vorangegangenen Abschnitt dargelegt, könnte die Aktivität des RES zu einer Zerstörung des Makroamylasekomplexes führen. Hierdurch würde die Gültigkeit des theoretischen Konzepts über den Clearance-Quotienten in Zweifel gestellt.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß der Quotient Amylaseclearance zu Kreatininclearance weder zur Diagnose einer Makroamylasämie noch zur Differentialdiagnose einer akuten Pankreatitis geeignet ist. Der einzige bisher sichere Makroamylasenachweis gelingt nur mit laborchemischen Methoden, insbesondere mit der allgemein anerkannten Gelfiltration mit Sephadex. Nur wenn dieser Nachweis erbracht ist, kann man nach unserer Ansicht von einer Makroamylase sprechen.

V. Zusammenfassung

=====

In einem Zeitraum von 11 Monaten wurden Serumproben von allen Patienten der Klinik mit erhöhter Serumamylaseaktivität auf das Vorliegen einer Makroamylasämie mit der Gelfiltration auf Sephadex G-100 untersucht. Zusätzlich wurden noch folgende Nachweismethoden angewendet : Dünnschichtchromatographie, Ultrazentrifugation im Rohrzuckerdichtegradienten und Elektrophorese auf Cellogelstreifen. Gleichzeitig wurde der Quotient Amylaseclearance zu Kreatininclearance auf seine Brauchbarkeit zur Diagnose einer Makroamylase und Differentialdiagnose einer Pankreatitis geprüft.

Insgesamt fanden wir in unserem Patientenkollektiv von 190 Personen, die entsprechend ihren Diagnosen in verschiedene Gruppen eingeteilt wurden, drei Fälle von Makroamylasämie (= 1,6 %). Diese wiesen folgende Diagnosen auf : Kleinzelliges Bronchialcarcinom, chronische Niereninsuffizienz bei chronisch entzündlicher Nierenerkrankung und Leberzirrhose bei chronischem Alkoholabusus.

Der Quotient Amylaseclearance - Kreatininclearance wurde bei allen 190 Patienten bestimmt. In 15 % der Fälle war der Quotient, wie dies für Makroamylase als typisch beschrieben wurde, auf Werte unter 0,01 erniedrigt. Durch laborchemische Methoden

konnte in allen diesen Fällen das Vorliegen einer Makroamylasämie mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Entgegen Mitteilungen in der Literatur ist demnach der Quotient nicht als Suchtest zur Erfassung einer Makroamylasämie geeignet. Auch Quotienten über dem Normalbereich sind nach unseren Befunden vieldeutig und zur differentialdiagnostischen Einordnung einer erhöhten Amylaseaktivität im Serum keine Hilfe.

Bestätigen konnten wir Berichte, nach denen eine Makroamylasämie auch bei normaler Aktivität der Serumamylase möglich ist.

Als zusätzlichen Befund fanden wir bei erhöhten Serumkreatininwerten bei Patienten mit Niereninsuffizienz eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Serumkreatininspiegel und dem Wert des Clearance-Quotienten. Dies bedeutet, daß die Amylaseclearance mit zunehmender Niereninsuffizienz relativ weniger beeinflußt wird als die Kreatininclearance.

VI. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- =====
1. Amman, R.W., Berk, J.E. and Fridhandler, L. :
Hyperamylasemia with carcinoma of
the lung.
Ann. Int. Med. 78: 521-525 (1973)
 2. Aw, S.E., Hobbs, J.R. and Wootton, J.D.P.:
Urinary isoamylases in the diagnosis
of chronic pancreatitis.
Gut 8: 402 (1967)
 3. Barrows, D., Berk, J.E. and Fridhandler, L. :
Macroamylasemia - Survey of prevalence
in a mixed population.
New Engl. J. Med. 1352 (1972)
 4. Berggren, T. and Levitt, M.D. :
An unusual form of macroamylasemia.
Gastroenterology 67: 149-154 (1974)
 5. Berk, J.E. :
Hyperamylasemia : Beacon or siren?
Ann. Int. Med. 9: 665 (1974)
 6. Berk, J.E., Fridhandler, L. and Montgomery, K. :
Simulation of macroamylasemia by salivary-
type (S type) hyperamylasemia.
Gut 14: 726-729 (1973)
 7. Berk, J.E., Kawagucki, and Zeinek :
Fractionation of serum amylase.
Bull. Mt. Sinai Hosp. 9: 217 (1961)
 8. Berk, J.E., Kizu, H., Geller, E. and Fridhandler, L. :
Macroamylasemia : Observations on the
nature of macroamylase.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 131: 154-159 (1969)
 9. Berk, J.E., Kizu, H., Wilding, R. and Searey, R.L. :
Macroamylasemia : A newly recognized cause
for elevated serum amylase activity.
New Engl. J. Med. 227: 941-946 (1967)

10. Block, M.B., Berk, J.E., Fridhandler, L., Steiner, D.F.
and Rubenstein, A.H. :
Diabetic ketoacidosis associated with mumps
virus infection.
Occurrence in a patient with macroamylasemia.
Ann. Int. Med. 78: 663-667 (1973)

11. Davis, T.J. :
A fast technique for the separation and
detection of amylase isoenzymes using a
chromogenic substrate.
J. clin. Path. 25: 266 (1972)

12. Davis, J., Berk, J.E., Take, S. and Fridhandler, L. :
Electrophoretic characteristics of macro-
amylasemic serum.
Clin. Chim. Acta 35: 305-309 (1971)

13. Dreiling, D.A. and Leichtling, :
The amylase-creatinine clearance ratio.
Am. J. Gastroenterology 61: 290-296 (1974)

14. Dreiling, D.A., Janowitz, H.D., Marshall, D. and
Haemmerli, P. :
Relationship between blood amylase and factors
affecting carbohydrate metabolism. The
regulation of blood amylase in subjects
without pancreatic disease.
Am. J. Dig. Dis. 3: 214-219 (1958)

15. Dreiling, D.A., Rosenthal, W.S., Kass, M. and
Janowitz, H.D. :
Relationship between blood amylase and factors
affecting carbohydrate metabolism.
II. The influence of ACTH, hydrocortisone,
liver disease and pancreatectomie.
Am. J. Dig. Dis. 4: 731-736 (1959)

16. Dürr, H.K. :
Methoden der Amylasebestimmung.
In: Engelhardt, A. und Lommel, H. (Herausg.) :
Methodische Fortschritte im medizinischen
Laboratorium, Bd. 2 ; Malabsorption,
Maldigestion.
Verlag Chemie; Weinheim 1974

17. Flodin, P. and Killander, J. :
Fractionation of human serum proteins by
gel filtration.
Biochem. Biophys. Acta 63: 403-410 (1962)

18. Freeman, T. and Smith, J. :
Human serum protein fractionation by
gel filtration.
Biochem. J. 118: 869-873 (1970)
19. Fridhandler, L., Berk, J.E. and Ueda, M. :
Macroamylasemia : Rapid detection method.
Clin.Chem. 17: 423 (1971)
20. Franzini, C. :
Gel filtration applied to some clinical
problems.
J. Chromatography 28: 37-43 (1967)
21. Gourgontis, G.D. :
Postoperative hyperamylasemia.
Amer. Surgeon 111-115 (1973)
22. Gullick, H.D. :
Relation of the magnitude of blood enzyme
elevation to severity of exocrine pancreatic
disease.
Dig. Dis. 18: 375-383 (1973)
23. Hammerton, K. and Messer, M. :
The effects of adrenalin, glucagon, insulin
and dibutyryl cyclic AMP on liver and
-amylase activities in the rat.
Clin. Chim. Acta 47: 283-288 (1973)
24. Hansen, H.R. von Kley, H. and Knight, W.A. :
Macroamylasemia due to binding by protein.
Ann. J. Med. 52: 712-720 (1972)
25. Harada, K., Nakayama, T., Kitamura, M. and Sugimoto, T. :
Immunological and electrophoretical approaches
to macroamylase analysis.
Clin. Chim. Acta 59: 291-299 (1975)
26. Hedger, R.W. and Hardison, W.G.M. :
Transient macroamylasemia during an exacer-
bation of acute intermittent porphyria.
Gastroenterology 60: 903-908 (1971)
27. Heggin, R. und Siegenthaler, W. :
Differentialdiagnose innerer Krankheiten.
Georg Thieme Verlag; Stuttgart

28. Henderson, A.R., King, J. and Imrie, C.W. :
Anomalous response of macroamylase to
assay temperature.
Clin. Chem. 19: 123-124 (1973)
29. Hobbs, J.R. :
Persönliche Mitteilung.
30. Imrie, C.W., King, J. and Henderson, A.R. :
Macroamylasemia - Survey of prevalence in
a mixed population.
New Engl. J. Med. 287: 931 (1972)
31. Imrie, C.W., King, J. and Henderson, A.R. :
Macroamylasemia : A report of two cases.
Scot. med. J. 18: 188-191 (1973)
32. Janowitz, H.D. and Dreiling, D.A. :
The plasma amylase.
Am. J. Med. 27: 924 (1959)
33. Kammaryt, J. :
Nieren-Clearance der Isoamylasen beim
Menschen.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 7 Jg., 51-52
(1969)
34. Kellner, R., Horstmann, H.J., Flügel, M. und
Tympner, F. :
Zur Diagnostik der Makroamylasämie.
Dtsch. med. Wschr. 99: 1772-1773 (1974)
35. Killander, J. and Flodin, P. :
The fractionation of serum proteins by gel
filtration.
Vox Sang. 7: 113 (1962)
36. Knight, A.H., Williams, D.N., Ellis, G. and
Goldberg, D.M. :
Significance of hyperamylasemia and
abdominal pain in diabetic ketoacidosis.
Brit. med. J. 3: 128-131 (1973)
37. Kohn, J. :
Separation of haemoglobins on cellulose
acetate.
J. Clin. Path. 22: 109-111 (1969)

38. Levine, R.J., Glauser, E.L. and Berk, J.E. :
Enhancement of the amylase-creatinin clearance
ratio in disorders other than acute pancreatitis.
New Engl. J. Med. 13: 329-332 (1975)
39. Levitt, M.D. and Cooperband, S.R. :
Hyperamylasemia from the binding of serum
amylase by an 115 IgA globuline.
New Engl. J. Med. 278: 474-479 (1968)
40. Levitt, M.D. and Cooperband, S.R. :
Increasing renal clearance of amylase in
pancreatitis.
New Engl. J. Med. 535 (1973)
41. Levitt, M.D., Duane, W.C. and Cooperband, S.R. :
Study of macroamylase complex.
J. Lab. Clin. Med. 80: 414-422 (1972)
42. Levitt, M.D., Goetzel, E.J. and Cooperband, S.R. :
Two forms of macroamylasemia.
Lancet 957-958 (1968)
43. Levitt, M.D., Rapoport, M. and Cooperband, S.R. :
The renal clearance of amylase in renal
insufficiency, acute pancreatitis and
macroamylasemia.
Ann. Int. Med. 71: 919-925 (1969)
44. Long, W.B. and Knowlessar, M.D. :
A rapid thin layer test for macroamylase with
observations on the nature of macroamylase
in six patients.
Gastroenterology 63: 564-571 (1972)
45. Miller, S.F., Whitaker, J.R. and Snyder, R.D. :
Incidence of elevated serum amylase levels
and pancreatitis after hyper abdominal surgery.
Am. J. Surg. 125: 535-537 (1973)
46. Morrissey, R., Berk, J.E., Fridhandler, L. and
Pelot, D. :
The nature and significance of hyperamylasemia
following operation.
Ann. Surg. 67-71 (1974)

47. Northman, M.M. and Callow, A.D. :
Investigations on the origin of amylase in
serum and urine.
Gastroenterology 60: 82-89 (1971)
48. Ojala, K. and Harmoinen, A. :
Determination of amylase activity and amylase
isoenzymes in serum and urine using a solid
phase blue starch substrate.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 35: 163-169 (1975)
49. Peeters, T.L. and Vantrappen, G.R. :
A screening technique for macroamylasemia
using thin layer gel filtration.
Clin. Chim. Acta 47: 437-441 (1973)
50. Penn, J., Durst, A.L. and Machado, M. :
Acute pancreatitis and hyperamylasemia in
renal homograft recipients.
Arch. Surg. 105: 167-172 (1972)
51. Pharmacia :
Thin-layer gel filtration with the Pharmacia
TLG-apparatus.
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden 1973
52. Pharmacia :
Sephadex.
Gel filtration in theory and practice.
Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden 1973
53. Rosier, R.-G. :
Amylase-creatinine clearance ratio in pancreatitis.
New Engl. J. Med. 922 (1975)
54. Ross, M.E. and Wolf, R.O. :
Pancreatic isoamylases.
Ann. Int. Med. 81: 566 (1974)
55. Rotn, J.A. :
Patients with hyperbilirubinemia and hyper-
amylasemia : Is the diagnosis pancreatitis
or biliary lithiasis?
Amer. Surgeon 40: 321-325 (1974)
56. Rothenberger, W., Patzkewitsch, L. und Weber, K.H. :
Makroamylasämie.
Bericht über zwei Fälle.
Dtsch. med. Wschr. 100: 1599-1601 (1975)

57. Shashaty, G.G. and Atamer, M.A. :
Acquired bisalbuminemia with hyperamylasemia.
Dig. Dis. 17: 59-67 (1972)
58. Shoji, Sh., Sugita, H. and Toyokura, Y. :
Macroamylasemia with cerebral thrombosis:
Report of a case.
AMA Arch. Surg. 73: 305 (1956)
59. Spiegel, M., Oelz, O., Knob, M. :
Makroamylase als seltene Ursache der Hyper-
amylasämie.
Klin. Wschr. 50: 548-551 (1972)
60. Spiegel, M., Oelz, O., Knob, M. und Biswanger, U. :
Makroamylase als Ursache erhöhter Serum-
amylaseaktivität.
Helv. med. Acta 36: 230-231 (1972)
61. Stein, A.M. :
Macroamylasemia.
Postgrad. Med. 55: 103-105 (1974)
62. Stone, J.R. and Herron, G.R. :
Macroamylasemia : Value of rapid diagnosis.
JAMA 224: 1529 (1973)
63. Take, S., Fridhandler, L. and Berk, J.E. :
Macroamylasemia : Possible role of poly-
saccharide in composition of macroamylase.
Clin. Chim. Acta 27: 369 (1970)
64. Tompkins, R.K. and Adams, J.R. :
Macroamylasemia in the postoperative patient.
Arch. Surg. 105: 630-632 (1972)
65. Ueda, M., Berk, J.E. and Fridhandler, L. :
Macroamylasemia: Variations in the response
of the macroamylase complex of acidification.
Proc. Soc. exp. biol. Med. 173: 1152 (1971)
66. Ueda, M., Berk, J.E., Fridhandler, L. and Davis, J. :
Ultracentrifugal characteristics of macro-
amylasemic serum.
Clin. Chim. Acta 35: 299-304 (1971)

67. Warshaw, A.L. and Fuller, A.F. :
Specificity of increased renal clearance of
amylase in diagnosis of acute pancreatitis.
New Engl. J. Med. 292: 325-328 (1975)
68. Wilding, P. :
Use of gel filtration in the study of
human amylase.
Clin. Chim. Acta 5: 913-924 (1963)
69. Wilding, P., Cooke, W.T. and Nicholson, G.I. :
Globuline-bound amylase (a cause of persistently
elevated levels in serum).
Ann. Int. Med. 60: 1053-1059 (1964)
70. Wilding, P., Geokas, M.C. and Haverbaek, B.J. :
Hyperamylasemia due to protein-bound
amylase.
Amer. J. Med. 47: 492-496 (1969)
71. Williams, D.N. :
Thin layer gel filtration.
Laboratory Practice 306-310 (1973)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Ch. Bode und Herrn Dr. H. Dürr für die Überlassung des Themas sowie für ihre wertvollen Anregungen und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Abfassung dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f

=====

Am 21.4.1951 wurde ich als fünftes Kind des Veterinärmediziners Prof. Dr. med. vet. habil. Herbert Bindrich und seiner Ehefrau Waltraut Bindrich, geb. Diester, in Greifswald geboren.

Ostern 1960 verlegten meine Eltern ihren Wohnsitz in die Bundesrepublik, zunächst nach Hannover und 1964 nach Stade. 1970 absolvierte ich im Athenaeum Stade mein Abitur mit Auszeichnung.

Nach einem Semester Biologiestudium an der Universität Hamburg, begann ich im Sommersemester 1971 mein Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg.

Im Wintersemester 1971/72 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung mit "gut".

Im Mai 1973 heirate ich die damalige Psychologiestudentin Elke Bindrich, geb. Rathjens.

Im Oktober 1973 verstarb mein Vater.

Im Sommersemester 1973 bestand ich die ärztliche Vorprüfung mit der Note "sehr gut".

Meine besonderen Interessen liegen auf dem Gebiet der Inneren Medizin, Psychosomatik und der Psychopathologie.

Im Wintersemester 1973/74 arbeitete ich an einem Forschungsprojekt über Ursachen der Konversionshysterie bei Kindern an der Universitäts-Kinderpsychiatrie Marburg mit. Zum Wintersemester 1974 begann ich meine Dissertation über das Thema : "Zur Häufigkeit einer Makroamylasämie und zur diagnostischen Wertigkeit des Quotienten Amylase-clearance/Kreatininclearance" bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bode. Die Arbeit beendete ich im Frühjahr 1976.

Mein Staatsexamen bestand ich zu Beginn des Wintersemesters 1976.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die
Damen und Herren Professoren und Dozenten :

Amon, Arndt, Aurich, Barthelmai, Bode, Buchholz,
Castenholz, Daume, Dimroth, Dittrich, Dombrowski,
Eißner, Eschenbach, Exner, Friederich, Ganz,
Gerdes, Graul, Haberich, Hamelmann, Hardewig,
Havemann, Heene, Hensel, Heß, Hildebrand,
Hilgenmann, Hort, Huch, Jakob, Kaffarnik, Karlson,
Kessler, Klaus, Kleinsasser, Koecke, Lange, Langner,
Ludwig, Mannheim, Maroske, Martini, Ochmig, Oepen,
Petry, Portig, Pots, Remschmidt, Richter, Riecken,
Rodeck, Rohen, Schmidt, Schiff, Siegert, Straub,
Streicher, Thoenes, Uhlarik, Walcher, Wehmeyer,
Wendt, Willenbockel.

